

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA
DEL FARMACO**

**XX ciclo
2004 - 2007**

**ISOLAMENTO, CARATTERIZZAZIONE
STRUTTURALE E VALUTAZIONE
DELL'ATTIVITÀ BIOLOGICA DI METABOLITI
SECONDARI DI ORIGINE MARINA E VEGETALE**

Tutor: Prof. Franco Zollo

Dr. Fulvio Gala

Coordinatore:

Prof.ssa Maria Valeria D'Auria

INDICE

Introduzione	1
Presentazione del lavoro svolto	6
Metaboliti di origine naturale agenti sul citoscheletro	8
Poriferi	8
Citoscheletro	13
Metaboliti che agiscono sui microtubuli	16
Metaboliti che agiscono sui microfilamenti	17
Metaboliti destabilizzanti i microfilamenti	17
Metaboliti stabilizzanti i microfilamenti	20
Jaspis splendans	23
Estrazione ed isolamento	23
Jaspamide D	26
Jaspamide E	32
Jaspamide F	36
Jaspamide G	39
Jaspamide H	42
Jaspamide I	45
Jaspamide J	47
Jaspamide K	48
Jaspamide L	50
Jaspamide M	52
Jaspamide N	54
Dati NMR	56
Attività farmacologica	61
Capsicum annuum L.	64
Classificazione Botanica	65
Capsicum Annuum L.	66
Composizione ed attività farmacologica	68
Estrazione ed isolamento	73
Capsianoside I metilestere	75

Capsianoside VIII	78
Capsianoside IX	82
Capsianoside L	85
Altri metaboliti isolati	87
Dati NMR	89
Attività farmacologica dei metaboliti isolati	91
Foeniculum Vulgare M.	93
Descrizione botanica	93
Composizione ed attività farmacologica	94
Estrazione ed isolamento	96
Foeniculoside X	100
Foeniculoside XI	104
Dati NMR	106
(3'R)-5-idrossi-3-(3' idrossibutil) isobenzofuran-1-(3H)-one	107
Attività farmacologica dei metaboliti isolati	110
Sangre de drago	112
Descrizione botanica	112
Attività farmacologica del sangue di drago	113
Estrazione ed isolamento	116
Analisi dei metaboliti isolati	119
Glucoside dell'acido fluoribundico	121
2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossi]-propan-1,3-diolo	123
Diidroblumenolo A	125
Dati NMR	127
Attività farmacologica	128
Parte sperimentale	130
Bibliografia	133

INTRODUZIONE

La natura è da sempre un'affascinante fonte d'interesse per gli studiosi alla continua ricerca di nuove sostanze farmacologicamente attive. Fin dai tempi più remoti, infatti, con il suo spirito di osservazione l'uomo ha imparato a conoscere, a poco a poco, le virtù medicinali, di molte piante ed a utilizzarne foglie, semi, rizomi ed essenze, a scopo curativo.

Tuttavia, solo nel XIX secolo, con l'isolamento di molti dei principali costituenti attivi di alcune droghe, è stato possibile studiare le specifiche relazioni tra composizione chimica e attività farmacologica delle piante medicinali e successivamente definire il ruolo dei cosiddetti metaboliti secondari.

Per molti anni i metaboliti secondari, sono stati considerati poco più che semplici prodotti di scarto ('waste products') senza una funzione apparente sia nelle piante che negli organismi marini. Successivamente studi più accurati hanno evidenziato il loro ruolo fondamentale anche in moltissime fasi della vita vegetale e marina.

Mentre i metaboliti primari (proteine, acidi nucleici, polisaccaridi), infatti, assolvono le funzioni essenziali alla crescita ed alla vita dell'organismo quali la nutrizione e i processi metabolici, il termine metabolita secondario, fa riferimento, invece, a quei composti che partecipano per lo più a meccanismi ecologici d'interazione con altri organismi e con tutto l'ambiente circostante.

Nelle piante, per esempio, molti di questi sembrano svolgere un importante significato adattativo nella protezione contro gli erbivori e contro le infezioni microbiche, ed avere un interessante ruolo come attrattivo negli impollinatori e per la dispersione dei semi mediata dagli insetti. Altri metaboliti secondari, invece, svolgono un ruolo fondamentale come agenti chimici allopatrici che influenzano la competizione tra le piante stesse.

I metaboliti secondari sono caratterizzati da un'enorme variabilità strutturale con molti centri chirali e diversi gruppi funzionali che ne determinano la specifica azione farmacologica.

È possibile classificarli da un punto di vista chimico o biosintetico. Considerando le caratteristiche chimiche la maggior parte appartengono soprattutto al gruppo dei fenoli e a quello dei composti contenenti azoto (es.alcaloidi), ma di molto importanti ne ritroviamo anche in altri gruppi caratterizzati da diversi scheletri carboniosi (antracene, cumarine, chinone, indolo).

Nella classificazione basata sull'origine biosintetica il gruppo dei terpeni è sicuramente quello più rappresentativo. A questo gruppo appartengono tutti quei composti che si originano tramite il pathway biosintetico degli isoprenoidi che usa building block di C₅ per

costruire catene di C₁₀ (monoterpeni), di C₁₅ (sesquiterpeni), di C₂₀ (diterpeni), di C₃₀ (triterpeni) e di C₄₀ (carotenoidi) (Figura 1).

Altre due vie biosintetiche molto utilizzate per la sintesi di metaboliti secondari sono quelle dei fenilpropanoidi e dei polichetidi che usano building blocks rispettivamente di fenilalanina/tirosina (C₉) e acetato (C₂).

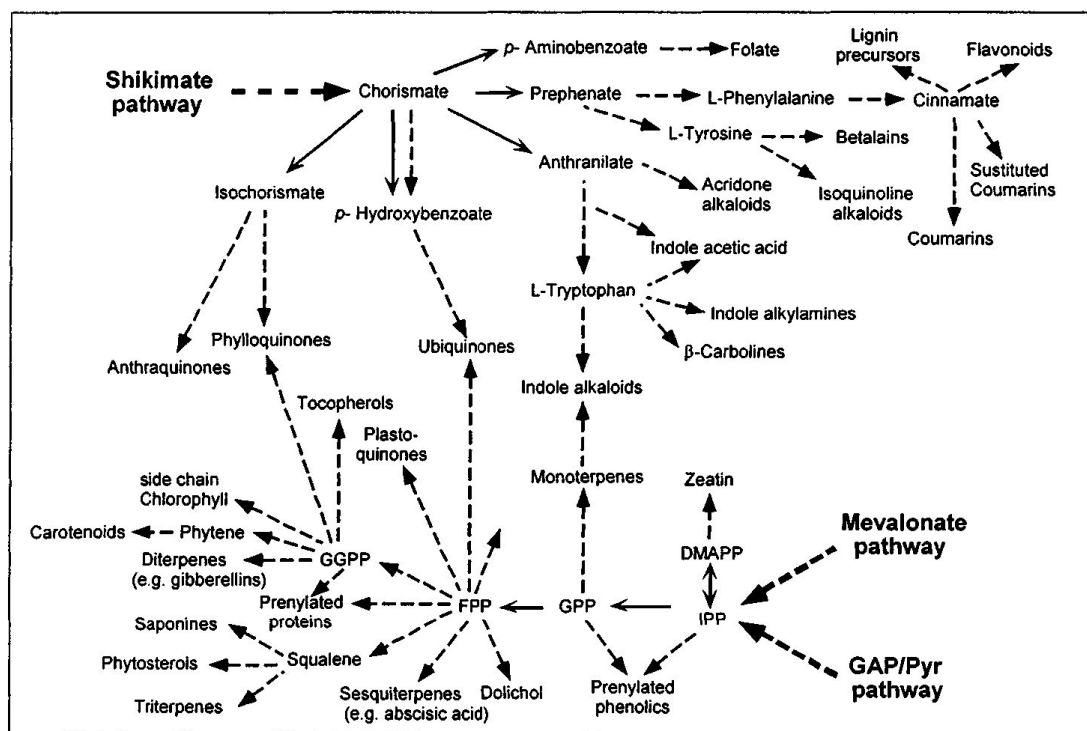


Figura 1. La via dello shikimato e dei terpeni, i due pathways che maggiormente contribuiscono alla sintesi di metaboliti secondari

Un numero inferiore di composti è quello che deriva, invece, da amminoacidi, come alcuni alcaloidi derivanti da triptofano, lisina ed ornitina.

Gli scheletri ottenuti dai singoli pathway sono stati, nel corso dell'evoluzione, ulteriormente modificati nei differenti organismi vegetali e marini. L'aggiunta di gruppi funzionali, le isomerizzazioni, l'apertura di un anello seguita dalla chiusura dello stesso, i legami tra più unità strutturali hanno determinato la sintesi di una notevolissima varietà di composti dimostrando come la natura utilizzi la chimica combinatoriale da milioni di anni.

Quest'enorme variabilità strutturale e la vastità di applicazioni che tali metaboliti possono trovare a livello industriale sono i responsabili del crescente interesse nei confronti dei prodotti naturali del metabolismo secondario delle piante e degli organismi marini.

I monoterpeni, ad esempio, sono i componenti delle essenze volatili dei fiori e degli oli essenziali di erbe e spezie ed, isolati mediante distillazione o estrazione, sono

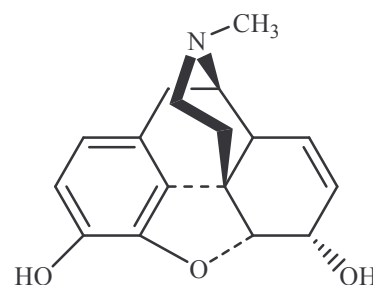
abbondantemente usati nell'industria degli aromi e dei profumi. I fenoli vegetali, invece, sono coinvolti nell'industria del legno, nonché in quella alimentare e delle bevande. I derivati del cinnammato e del gingerolo impartiscono, infatti, rispettivamente il gusto di cannella e zenzero mentre gli allifenoli come l'eugenolo danno il caratteristico gusto ed odore dell'olio di chiodi di garofano.

Il ruolo più interessante è però sicuramente quello che i metaboliti secondari svolgono in campo farmaceutico.

Attualmente i tre quarti delle classi di farmaci utilizzati derivano direttamente o indirettamente dall'isolamento e caratterizzazione di molecole presenti nei medicinali di origine vegetale, già noti nella medicina popolare.

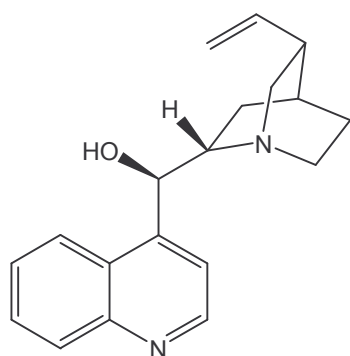
Gli esempi più classici sono:

— la **morfina**,¹ capostipite degli analgesici narcotici, è ancora attualmente il farmaco di maggior utilizzo nella terapia del dolore, grazie alla sua alta capacità di mimare l'azione delle endorfine sul sito attivo dei nocicettori. L'alcaloide è stato isolato nel 1806 dal farmacista Friedrich Sertürner dal lattice condensato,



morfina

chiamato oppio, del *Papaver somniferum*. La droga, però, soprattutto per le sue proprietà narcotiche era conosciuta da millenni: risale, infatti, al 4000 a.C. un ideogramma sumero che descrive il papavero da oppio come pianta della felicità. Nella tradizione greco-romana viene menzionata nell'“Odissea” per le sue proprietà ipnotiche e Galeno la utilizzò sotto forma di pozione per curare l'imperatore Marco Aurelio.

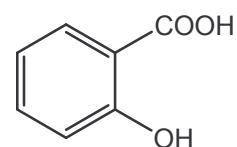


chinina

— la **chinina** e l'**artemisina**, principi attivi utilizzati tuttora per la cura delle varie forme di malaria, sono state isolate rispettivamente nel 1820 e nel 1970. Questa attività antiprotozoaria, tuttavia, era già conosciuta dagli Incas che assumevano chinina utilizzando infusi della corteccia della

Chinchina pubescens, e dai Cinesi che nel I secolo a.C. usavano artemisina estraendola con metodi alquanto primitivi dalle foglie di *Artemisia annua*.

— l'**acido salicilico**, substrato chimico per la sintesi dell'**acido acetilsalicilico**, primo antipiretico e antinfiammatorio non steroideo, è stato isolato nel 1829 dalla corteccia della *Spirea ulmaria* o salice bianco. Le proprietà antifebbrili e analgesiche



ac. salicilico

della droga si ritrovano, tuttavia, nei papiri di Erbes. Inoltre, Ippocrate, quattro secoli prima di Cristo, consigliava tisane a base di scorza e foglie di salice per alleviare i dolori delle partorienti.

Morfina, chinina e acido salicilico sono però solo tre dei numerosissimi esempi di metaboliti secondari che negli ultimi decenni hanno avuto un ruolo cruciale nello sviluppo di nuovi farmaci. L'enorme varietà della natura rende il mondo vegetale e quello degli organismi marino come la più grossa fonte di 'lead compounds', ovvero di composti da poter poi, con l'aiuto delle più moderne tecniche di sintesi, modificare in molecole con migliori caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche.

La principale difficoltà nello studio di un fitocomplesso (o di un organismo marino) va associata principalmente alla variabilità della sua composizione chimica. Campioni di diversa origine appartenenti alla stessa specie vegetale possono, infatti, avere una composizione chimica quantitativamente o talvolta anche qualitativamente differente. Molte specie vegetali sono caratterizzate dalla presenza di varianti del chemiotipo (per esempio la valeriana), che sono morfologicamente e geneticamente indistinguibili e, di conseguenza, non giustificano la loro separazione in specie o sottospecie distinte.

Una ulteriore fonte di variazione nella composizione delle droghe e preparazioni vegetali nominalmente uguali è costituita dai processi di lavorazione che le piante medicinali subiscono dopo la raccolta/mietitura. Possono infatti influire sulla composizione chimica i tempi che intercorrono fra la raccolta/mietitura e l'essiccamento (possibilità che si innescino processi fermentativi con degradazione di determinati principi attivi e la formazione di altri), l'adeguatezza del processo di essiccamento (possibilità di perdere principi attivi volatili), la fumigazione e gli altri interventi contro i parassiti, i sistemi di stoccaggio (per esempio le basse temperature o il congelamento quando necessari, il controllo dell'umidità, la protezione dalla luce) e di trasporto delle droghe. La composizione chimica di una pianta non è uniforme in tutte le parti che la compongono, poiché determinati principi attivi possono essere molto concentrati in uno specifico organo, per esempio le radici, ed essere invece meno concentrati o assenti in altri. Inoltre, la composizione chimica di una pianta varia durante la crescita, nel senso che certi principi attivi possono essere presenti solo nell'età giovanile e scomparire negli esemplari maturi o viceversa, oppure avere vita effimera (per esempio, solo all'epoca della fioritura oppure dal momento in cui una pianta annuale comincia a perdere di vitalità dopo la maturazione dei frutti; allo stesso modo, possono aversi differenze nette di composizione fra frutti acerbi e frutti maturi di una stessa specie, per esempio arancio amaro). Quindi, l'esatto momento della raccolta/mietitura (chiamato *tempo balsamico*)

riveste una importanza fondamentale nel determinare la costanza di composizione fra le droghe di una stessa specie vegetale. Alla fine, rimangono da prendere in considerazione le diversità di composizione che possono caratterizzare i vari tipi di preparazioni ottenibili da una stessa specie vegetale in relazione agli specifici processi di preparazione adottati e le diversità di composizione che possono caratterizzare preparazioni nominalmente uguali in relazione alle varianti introdotte nello stesso processo. Poiché i processi adottati per ottenere le varie preparazioni sono sostanzialmente di frazionamento, cioè mirano a concentrare nella preparazione i composti ritenuti utili e a escludere i composti invece ritenuti inutili, è intuitivo che la natura di questi processi costituisca una fonte primaria di diversificazione nella composizione chimica.

Procedimenti completamente differenti, come per esempio la distillazione e l'estrazione con un solvente, portano inevitabilmente a composizioni differenti che sono correlate con le caratteristiche chimico-fisiche dei singoli costituenti (per esempio i composti solidi insolubili in acqua e quelli liquidi a bassa tensione di vapore non possono essere presenti in un olio essenziale). Gli estratti hanno composizioni diverse a seconda del tipo di solvente impiegato. Nel caso degli estratti, oltre il tipo di solvente impiegato, possono determinare diversità di composizione il volume del solvente rispetto alla quantità della droga da estrarre, lo stato fisico della droga, livello della frantumazione, il tempo di contatto fra la droga e il solvente, la temperatura di estrazione ed eventuali altri fattori fisici di processo (per esempio l'applicazione di una pressione).

Presentazione del lavoro svolto:

La mia attività di studio durante i tre anni di dottorato ha seguito due differenti tematiche finalizzate entrambe, alla ricerca di nuovi metaboliti secondari con attività farmacologica.

Una prima linea di ricerca ha avuto come oggetto la spugna marina *jaspis splendans* raccolta nei mari della Nuova Caledonia, ed ha permesso l'isolamento e la caratterizzazione strutturale di ben undici nuovi analoghi strutturali del ciclodepsipeptide jaspamide.

Caratterizzata da una porzione tripeptidica legata mediante un legame di tipo estereo ed uno ammidico ad una porzione polichetidica, la jaspachinolide (nota anche come jaspamide), è ben nota per la sua capacità di legare l'actina F competitivamente con la falloidina, stabilizzare i microfilamenti e indurre la polimerizzazione.

I nuovi metaboliti isolati presentano modifiche sia nella porzione peptidica che in quella di polipropionato, ma tutti in saggi effettuati su linee cellulari MCF-7 ed HT-29 hanno mostrato una potente attività citotossica. Studi più approfonditi hanno poi permesso di identificare per tutti, un estensivo cambio nella morfologia dei microfilamenti con sviluppo di "loci" di aggregazione e perdita di organizzazione dell'intero citoscheletro cellulare.

L'isolamento di questi nuovi analoghi fornisce importanti elementi per un'analisi delle modalità d'interazione della jaspamide con il suo sito recettoriale e per la definizione della struttura farmacoforica responsabile dell'attività antimicrofilamento.

Una seconda linea di studio si inserisce in un più ampio progetto di ricerca di metaboliti secondari da piante alimentari dell'area mediterranea, in corso, da anni, presso il gruppo di ricerca cui appartengo. Il *foeniculum vulgare* ed il *capsicum annuum*, i cui frutti sono ingredienti comunissimi nella cucina mediterranea, sono stati oggetto del mio studio che ha condotto all'isolamento di nuovi metaboliti con importante attività antiossidante.

Dai pericarpi del *capsicum annuum* sono stati, infatti, isolati quattro nuovi metaboliti secondari appartenenti alla famiglia dei capsianosidi che studi di attività farmacologica hanno evidenziato possedere anche una buona azione antipertensiva per inibizione dell'enzima ACE.

Contemporaneamente sono stati isolati anche altri composti noti tra cui il capsidiolo che in studi effettuati in collaborazione con il Dipartimento di Biologia dell'università di Perugia ha mostrato un'attività anti *Helicobacter pylori* comparabile al metronidazolo, farmaco d'elezione nella comune pratica medica.

Studi, invece, sui semi del *foeniculum vulgare* hanno condotto all'isolamento di nuovi analoghi strutturali del *cis*-miabenolo C un trimero dello stilbene noto per una potente azione antinfiammatoria ed un interessante attività citotossica che sembra essere legata ad una attività inibitoria della proteina chinasi C come evidenziato da lavori su linee cellulari tumorali di polmone. Analogamente è stato isolato il nuovo (3'R)-5-idrossi-3-(3' idrossibutil) isobenzofuran-1-(3H)-one che nel saggio TBARS ha mostrato un importante azione antiossidante a concentrazioni 10^{-6} M.

Durante il terzo anno di dottorato, invece, la mia attenzione si è focalizzata sulla resina dell'arbusto peruviano *Croton lechleri* noto come *sangre de drago* e da secoli utilizzata dalle popolazioni indigene per le più disparate attività farmacologiche: cicatrizzante, antivirale, antibatterico, antiulcera, antidiarroico nonché immunomodulante ed antitumorale.

Risultato dello studio è stata l'individuazione per la prima volta in piante appartenenti al genere *Croton*, di alcuni megastigmani come il blumenolo C, il blumenolo B e il diidroblumenolo A, numerosi lignani e del glucoside dell'acido fluoribundico.

Oltre ad arricchire il panorama di molecole isolate dal *sangre de drago* questo studio può essere utile per fare maggiore chiarezza sui metaboliti realmente responsabili di ognuna delle numerosissime attività attribuite al sangue de drago.

La caratterizzazione strutturale di tutti i composti è stata effettuata mediante tecniche spettroscopiche quali la risonanza magnetica nucleare (NMR), sia monodimensionale (^1H , ^{13}C) che bidimensionale (TOCSY, COSY, HMBC, HSQC e ROESY) e la spettrometria di massa ad alta risoluzione con sorgente ESI (ESI-MS) e FAB (HRMSFAB).

METABOLITI DI ORIGINE NATURALE

AGENTI SUL CITOSCHELETRO

Poriferi

Il mondo marino può essere paragonato alle matriosche russe “più ecosistemi in un unico grande contenitore”. Esso, infatti, copre un ampio range termico (dalle temperature gelide dell’Antartico ai 350 °C nel profondo “hydrothermal vents”), un vasto range di pressioni (1-1000 atm), ampio range di nutrienti (dagli oligotrofi agli eutrofi) e possiede, inoltre, estese zone illuminate e altrettante non illuminate. Questa enorme variabilità ha facilitato una estesa diversificazione a tutti i livelli filogenetici, dai microrganismi agli animali superiori.

Le prime notizie di utilizzo, da parte dell'uomo, di organismi marini per scopi non alimentari risalgono al 1600 a.C., quando i Cretesi osservarono che, con l'esposizione all'aria, un muco bianco, secreto da alcuni Gasteropodi marini (*Purpura*, *Murex*), veniva trasformato in un prodotto rosso porpora utilizzabile per la tintura dei tessuti. Stranamente, con il passare dei secoli l'uomo trascurò sempre più l'ambiente marino a favore di quello terrestre e, con lo sviluppo industriale avutosi all'inizio del secolo scorso, si ebbe un abbandono quasi totale della fonte marina per il ritrovamento di composti biologicamente attivi.

All'inizio degli anni '70, però, in diversi Paesi, molti gruppi di ricerca orientarono i loro studi su organismi marini. Tra quelli finora studiati, le spugne (Poriferi) si sono rivelate la fonte più ricca di metaboliti con interesse applicativo in campo farmaceutico.

Attualmente la diffusione delle spugne è molto ampia, occupano i mari fino anche ad alta profondità e si possono trovare anche nelle acque dolci. Le spugne provviste di fibra di spongine abbondano nelle zone tropicali, mentre quelle con scheletro calcareo o siliceo prevalgono nelle zone più fredde.

I Poriferi (o Spugne) appartengono al regno degli ‘animalia’ (Schema 1), anche se si ipotizza una loro origine filogeneticamente indipendente dagli altri animali.

Schema 1. Classificazione scientifica²

Regno:	<i>Animalia</i>
Sottoregno:	<i>Parazoa</i>
Phylum:	<i>Porifera</i>

Schematicamente il corpo di un porifero (Figura 2) può essere considerato a forma di sacco, tutto perforato (da qui il nome Poriferi) da pori inalanti, con una grossa apertura detta

osculo o poro esalante e una camera interna detta cavità gastrale. La parete è doppia, esternamente costituita dal foglio dermale e internamente da quello gastrale. Su quest'ultimo sono inserite delle cellule munite di flagelli (coanociti), il cui movimento crea una corrente d'acqua che entra dai pori inalanti, attraversa la cavità gastrica ed esce dall'osculo. Il movimento dell'acqua creato dai coanociti apporta ossigeno, assicurando così lo scambio dei gas respiratori, e particelle alimentari, che trattenute e digerite dagli stessi coanociti tramite l'emissione di pseudopodi vengono poi trasportate nei vari tessuti da cellule di tipo ameboide (amebociti).

All'interno del foglio dermale vi sono cellule piatte, pinacociti, e cellule contrattili, porociti. Tra il foglio dermale e quello gastrale è contenuto del mesenchima gelatinoso e proteico (mesoglea). In questa mesoglea si può trovare un'impalcatura scheletrica costituita da piccoli corpi calcarei o silicei (spicole) prodotti da cellule specializzate dette scleroblasti o da fibre di una scleroproteina (spongina) prodotta da particolari cellule dette spongioblasti.

L'organizzazione dei Poriferi presenta vari tipi di complicazione strutturale. Si distinguono, infatti, spugne di tipo *ascon*, *sycon* e *leucon*. Il primo tipo, *ascon*, caratteristico di spugne calcaree e di stadi larvali, si identifica nello schema semplificato su descritto. Nel secondo tipo di organizzazione, *sycon*, si formano tante evaginazioni dalla iniziale grossa cavità gastrale e solamente in esse sono situati i coanociti. Nelle spugne di tipo *leucon* la mesoglea è molto estesa e contiene tante piccole concamerazioni ricoperte di coanociti dette camere flagellate, le quali sono collegate alla cavità gastrale attraverso canali efferenti ed ai pori inalanti attraverso canali afferenti. I Poriferi sono generalmente ermafroditi e nella mesoglea sono presenti le cellule sessuali, spermatozoi ed ovocellule. Lo sviluppo è indiretto con uno stadio larvale di anfiblastula. Si assiste anche alla riproduzione asessuale: in condizioni ambientali sfavorevoli, quando il resto del corpo muore si formano delle gemme esterne, dette gemmule, le quali con il ripristino delle condizioni favorevoli si sviluppano in nuove spugne.

Le spugne possono essere da quasi trasparenti a vivacemente colorate per la presenza di pigmenti nelle cellule dermiche. La forma del corpo è influenzata, generalmente,

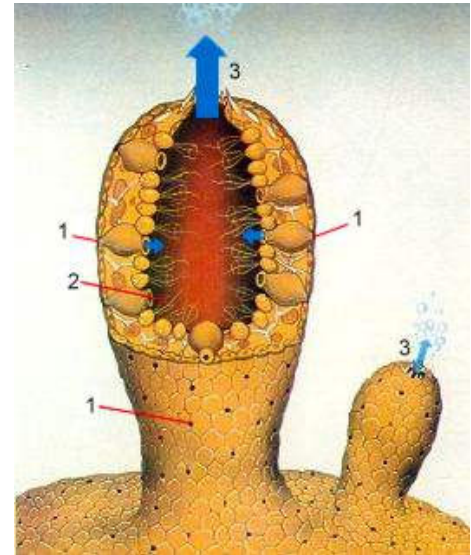


Figura 2. Schema di un porifero

1) pori inalanti

2) coanociti

3) pori esalanti

dall'ambiente di vita: in particolare, se la spugna si sviluppa in zone con forti moti ondosi o correnti può assumere una forma appiattita, globosa o incrostante, in modo da ridurre la resistenza al moto dell'acqua e non essere trascinata via; al contrario in acque più tranquille le spugne crescono acquistando forme a coppa, a candelieri o arborescenti.

I Poriferi sono suddivisi in circa 4800 specie che possono essere classificate, per maggiore comodità in quattro classi: Calcispongiae, Demospongiae, Hyalospongiae, Sclerospongiae.

- **Calcispongiae**

Le Calcispongiae (Fig.3) o spugne calcaree vivono a bassa profondità e sono in genere di grandezza ridotta. Sono caratterizzate dalla presenza di spicole calcaree, e la superficie del corpo è ruvida. Le spicole sono sempre isolate e di varia forma: aghiformi, a tre assi (triassone) o a quattro assi (tetrassone).

- **Demospongiae**

Dette anche spugne silicee o spugne cornee, (Fig.4) rappresentano la classe più vasta del phylum comprendendo il 95% delle specie note.

Diffuse in tutti i mari ed a tutte le profondità (esiste anche una famiglia d'acqua dolce), presentano scheletri selicei di spicole a 1 o 4 raggi (mai 6), oppure combinazioni reticolate di spicole silicee e spongina, oppure complessi fibrosi di sola spongina, queste ultime prive quindi di elementi scheletrici ed utilizzate dall'uomo come spugne da bagno.



Figura 3. Calcispongiae



Figura 4. Demospongiae

- **Hyalospongiae**

Sono anche dette spugne vitree, silicospongie o ialospongie. Sono in prevalenza forme di acque profonde o di acque basse tropicali, piccole o grandi, sorrette da un complicato intreccio di spicole silicee coerenti (macroscelere e microscelere) fra le quali predominano le forme triassone a sei raggi, da cui il nome di esattinellidi.

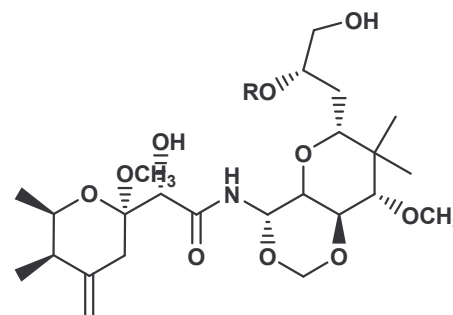
- **Sclerospongiae**

Le sclerospongie, dette anche spugne coralline, costituiscono una piccola classe di poriferi scoperta negli anni sessanta e poco conosciuta. Presentano uno scheletro robusto di cristalli di carbonato di calcio su un reticolo di fibre organiche.

In tali organismi, a causa dell'assenza di strutture organizzate per il movimento, di sistemi nervosi e muscolari, le principali funzioni di relazione con l'ambiente esterno sono affidate a mediatori chimici. Infatti, a causa della mancanza di organi di locomozione adatti alla fuga hanno sviluppato, nel corso dell'evoluzione, la capacità di sintetizzare metaboliti tossici come armi di difesa e/o di attacco contro i predatori, che possono rappresentare per l'uomo sostanze con un potenziale impiego farmaceutico.

Inoltre, la presenza nelle spugne di una notevole quantità di organismi simbiotici (batteri), capaci di sopravvivere nelle condizioni di temperature e pressioni più estreme ha reso i poriferi una fonte inesauribile di molecole con le strutture più insolite e l'attività farmacologica più disparata.

La **micalamide A**,³ isolata da spugne del genere *Mycale* nel 1988, ha mostrato, per esempio, un'ottima attività antivirale verso HSV-1, il virus responsabile della poliomielite di tipo I, mentre l'**avarolo**,⁴ isolato da *Disidea avara* è risultato da studi 'in vitro' capace di inibire il virus dell'immunodeficienza acquisita attraverso l'inibizione della trascrittasi inversa ed è correntemente utilizzato nella terapia topica della psoriasi.



Micalamide A R=H
Micalamide B R=CH₃

Il sesquiterpene **manoalide**,⁵ isolato nel 1980, da *Luffariella variabilis*, invece, è risultato essere un ottimo antinfiammatorio, con attività quasi paragonabile a quella dell'idrocortisone. Stessa attività per lo **scalaradiale**,⁶ isolato da *Cacospongia mollior*, che agisce da inibitore irreversibile della fosfolipasi A₂.

Da spugne del genere *Plakortis*, sono state isolate, invece, una notevole varietà di composti con struttura polichetaleica che hanno mostrato potente attività antifungina.⁷

L'attenzione dei ricercatori è stata rivolta, però, principalmente ai metaboliti aventi attività citotossica e antitumorale. Molti sono i target biochimici di un lead antitumorale e tra questi il citoscheletro riveste un ruolo molto importante poiché media una serie di eventi cellulari (mitosi, protusione, mobilità) che intervengono in processi associati al tumore, come le metastasi.⁸

La motilità cellulare permette, quindi, la diffusione delle cellule tumorali che, una volta acquistata una notevole proprietà invasiva, colonizzano altre zone del corpo, diverse da quelle di origine, dando luogo alla formazione di masse tumorali secondarie (metastasi).

La metastatizzazione è lo stadio più avanzato della cancerogenesi ed è peculiare dei tumori maligni, costituiti da cellule morfologicamente e funzionalmente molto diverse da quelle del tessuto originario. Tali cellule, nella loro moltiplicazione, formano propaggini che avvinghiano le normali cellule vicine distruggendole, così come il crostaceo fa con le sue chele nei riguardi della preda. Sulla base di tale osservazione è stato coniato il termine cancro (granchio).

Le spugne si sono rivelate un'importantissima fonte di *lead compounds* ad attività antitumorale, da sottoporre a modificazioni mirate all'ottenimento di analoghi a più elevata specificità e tossicità limitata.

Il Citoscheletro

Tutte le manifestazioni motorie che avvengono nelle cellule sono mediate dal citoscheletro.

Il citoscheletro è una struttura dinamica che contribuisce al mantenimento della forma della cellula, al suo movimento intra- ed inter- cellulare e svolge funzione di tipo contrattile e di protezione. È costituito da una fitta rete di microtubuli, microfilamenti e strutture accessorie implicate nella formazione del fuso mitotico, elemento fondamentale per la replicazione, e nella generazione di quella fitta rete di “binari” necessaria al movimento cellulare e al sostegno dei vari organuli citoplasmatici (Figura 5).

Esso è costituito da fibre di natura polimerica:

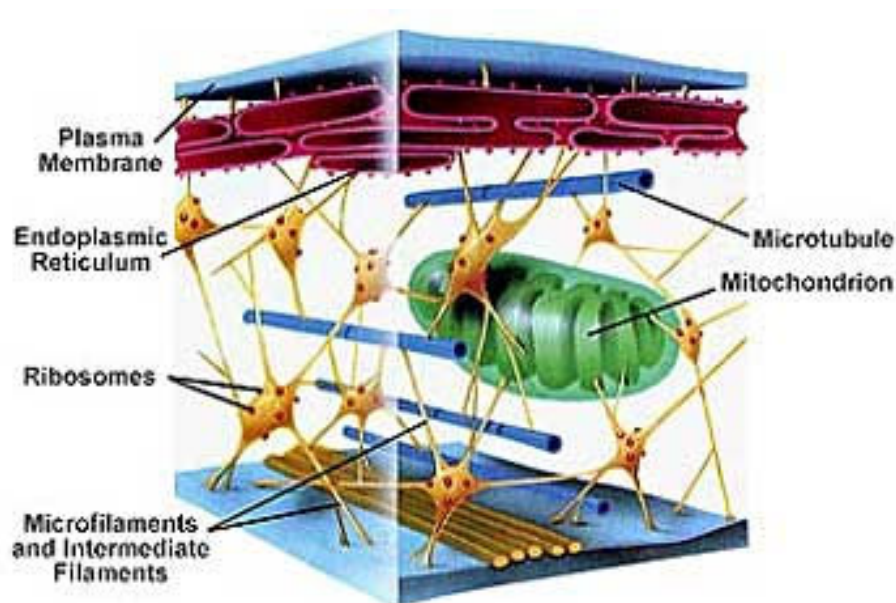
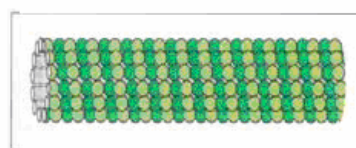


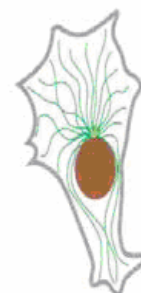
Figura 5. Il citoscheletro e altre strutture cellulari

- **i microtubuli**, tubi cilindrici di 20-25 nm di diametro, sono costituiti da dimeri di α e β tubulina. Agiscono da impalcatura determinando la forma della cellula, forniscono una serie di tracce per consentire agli organelli cellulari e alle vescicole di muoversi e formano anche le fibre del fuso per separare i cromosomi durante la mitosi. Svolgono, inoltre un ruolo fondamentale nella migrazione e

Microtubuli



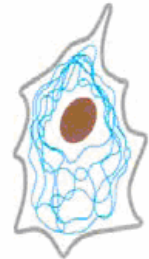
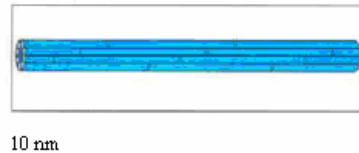
25 nm



nella polarità cellulare.⁹ Si allungano dall'estremità *più* e si disassemblano dall'estremità *meno*.

- i **filamenti intermedi**, sono così chiamati perchè hanno un diametro di circa 10 nm, intermedio tra quello dei microtubuli e quello dei microfilamenti. Possiedono una grande resistenza alla trazione e consentono alla cellula di sopportare stress meccanici ai fini di preservare l'integrità cellulare e tessutale.¹⁰

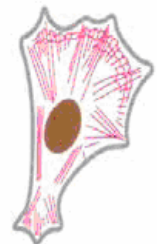
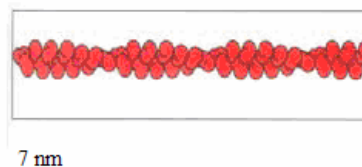
Filamenti intermedi



Hanno anche un ruolo critico nella trasduzione del segnale.

- i **microfilamenti di actina**, sottili fibre filamentose, di 3-7 nm di diametro, sono organizzate in fasci stabilizzati da legami trasversali.¹¹ Essi derivano dall'assemblaggio di monomeri di actina, una proteina globulare che lega ATP. Quando si trova nella forma monomerica è chiamata actina G (actina globulare). Quando polimerizza dando luogo a microfilamenti è indicata come actina F (actina fibrosa).

Microfilamenti di actina



Strutturalmente i filamenti di actina (F-actina) sono dei polimeri polari di lunghezza variabile e presentano un'estremità che polimerizza più rapidamente, chiamata "barbed-end" (estremità +), ed un'altra estremità che polimerizza più lentamente, definita "pointed-end" (estremità -).

La polimerizzazione prevede l'assemblaggio delle unità di actina G sotto forma di complesso con uno ione Mg^{2+} , profilina e ATP. L'addizione di ciascun monomero determina il rilascio della profilina: ciò facilita lo scambio dell'ATP con l'ADP promosso dall'attività ATP-asi.¹²

La polimerizzazione è regolata dalle "capping proteins", le quali incappucciano le "barbed-end" dei filamenti di actina prevenendo l'addizione e/o la perdita di subunità del polimero.¹³

Le capping proteins, insieme alla profilina e alle severing proteins, appartengono alla categoria delle ABP (Actin Binding Proteins). Mentre la profilina si lega ai monomeri di actina bloccando il loro assemblaggio in microfilamenti, le severing proteins (gelsolina e

fragmina) rompono i filamenti già assemblati riducendone la lunghezza. La concentrazione cellulare delle ABP regola quindi l'equilibrio tra Actina-G e Actina-F.

Quando la concentrazione delle ABP è elevata l'equilibrio è spinto verso la depolimerizzazione. Inoltre il loro effetto è spesso Ca^{++} dipendente: alle basse concentrazioni di Ca^{++} tipiche del citoplasma molte ABP, infatti, sono inattive e la loro attivazione scaturisce da un aumento di concentrazione del Ca^{++} stesso. La sensibilità mostrata da tali proteine inserisce il processo di assemblaggio/depolimerizzazione dei microfilamenti negli eventi cellulari regolati dalle variazioni nella concentrazione di tale ione a livello citoplasmatico. Inoltre molte ABP sono regolate anche dall'aggiunta o dalla rimozione di proteine fosfato. La fosforilazione, infatti, è in grado di attivare alcune proteine e di inibirne altre.

In una cellula attivata, i monomeri tendono ad aggiungersi alle “barbed-ends” e a dissociarsi alle “pointed-ends” determinando un allungamento del filamento all'estremità positiva e l'accorciamento all'estremità negativa.

Il risultato è uno spostamento del filamento, e di tutto il citoscheletro. Questo fenomeno è conosciuto come “Treadmilling”(Fig.6).

La protrusione di membrana che deriva dai cambiamenti nella lunghezza dei filamenti di actina dovuti al continuo equilibrio

polimerizzazione/depolimerizzazione, nonché dai cambiamenti nell'organizzazione e nelle proprietà della rete di actina stessa, come la densità e la geometria dei filamenti incrociati ed il riarrangiamento dell'intero citoscheletro, determina il movimento strisciante delle cellule.

Il ruolo fondamentale dell'actina nel movimento delle cellule lo ha reso uno dei target più studiati nella ricerca di metaboliti ad attività antitumorale. Alla base delle metastasi cellulare si pone, infatti proprio l'evento della migrazione cellulare in cui i microfilamenti, come descritto, hanno un ruolo primario.

L'attività anticitoscheletro dei metaboliti secondari finora isolati si esplica principalmente attraverso due differenti modalità d'azione rispettivamente sui microtubuli, sui microfilamenti.

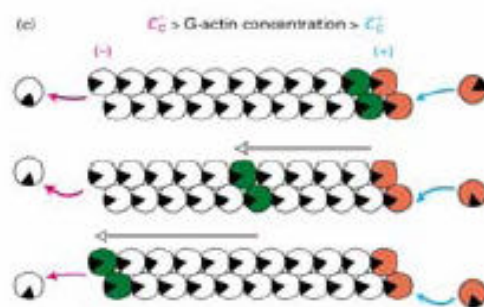


Figura 6. Treadmilling

Metaboliti che agiscono sui microtubuli

I microtubuli, a causa della loro partecipazione nella formazione del fuso mitotico, sono stati estensivamente studiati permettendo l'identificazione di un notevole numero di sostanze naturali utilizzabili come agenti terapeutici.¹⁴

Il più famoso tra questi è sicuramente il **tassolo**, isolato dalla pianta *Taxus brevifolia*, che agisce stabilizzando i microtubuli e inibendone la depolimerizzazione.¹⁵

Attualmente il tassolo ed alcuni suoi derivati (taxotere) rappresentano i farmaci di scelta per il trattamento di molti tumori, nonostante i molti effetti collaterali come l'ematotossicità

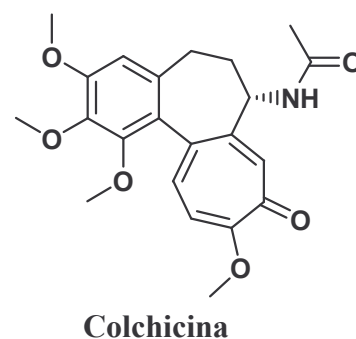
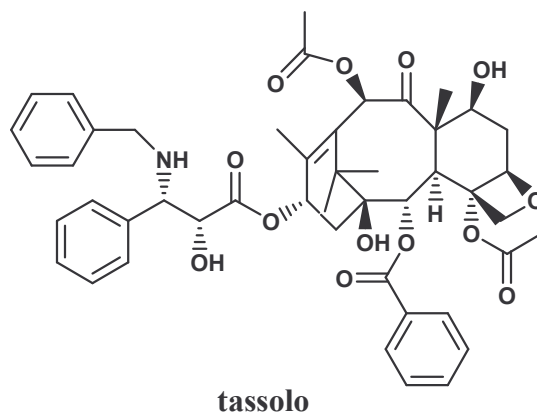
(neutropenia) e la neurotossicità, che si manifesta principalmente come neuropatia periferica.

La più vistosa limitazione clinica all'impiego del tassolo è però imputabile alla insorgenza del fenomeno di multidrug resistance (MDR) ovvero alla sovraespressione della glicoproteina P, che formando un canale di membrana aspecifico, abbassa il contenuto di farmaco intracellulare, permettendo alla cellula di sopravvivere anche in presenza di dosi massive dello stesso.

Queste osservazioni hanno stimolato la ricerca di nuovi farmaci ad azione tassolo-simile e risultati molto incoraggianti sono stati ottenuti dallo studio di metaboliti di origine marina quali gli **epotiloni**, l'**eleuterobina**, le **sarcodictine**, il **laulimalide** e il **discodermolide**,¹⁶ tuttora oggetto di un'intensissima attività di ricerca.

Al contrario del tassolo, che inibisce la depolimerizzazione, la **colchicina**, alcaloide estratto dal *Colchicum autumnale*, blocca la polimerizzazione della tubulina e distrugge i microtubuli, impedendo la formazione del fuso mitotico.

Anche gli alcaloidi della Vinca (**vinblastina**, **vincristina**, **vindesina**) bloccano l'attività della tubulina, inducendo delle reazioni di polimerizzazione aberranti. Essi sono correntemente utilizzati nella terapia di alcuni tumori, come particolari forme di leucemia, nel morbo di Hodgkin e nel carcinoma al seno.



Metaboliti che agiscono sui microfilamenti di actina

Molti metaboliti di origine sia animale che vegetale hanno come target i microfilamenti di actina. Essi alterano tutti i processi cellulari (migrazione, divisione, endocitosi, esocitosi ecc..) che si basano sull'attività citoscheletrica. Questi metaboliti si dividono in due categorie:

- quelli che destabilizzano i microfilamenti spostando l'equilibrio G-Actina – F-Actina a favore della G-Actina¹⁷ (citocalasine, latrunculine, misakinolide A, swinholide A, sfinxolidi, reidispongiolidi);
- quelli che stabilizzano i microfilamenti e inducono la polimerizzazione dell'actina, spostando, pertanto, l'equilibrio a favore della F-Actina (falloidina, amphidinolidi, geodiamolidi, jaspamidi). Pare che questa classe abbia un profilo farmacodinamico che meglio si presta ai fini di un possibile impiego chemioterapico.

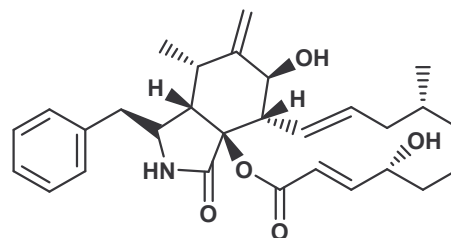
Metaboliti destabilizzanti i microfilamenti

A tale categoria appartengono molti metaboliti che agiscono come le ABP. Tra essi si distinguono:

- quelli che agiscono come le capping proteins.
- quelli che, analogamente alla profillina, legano i monomeri di G-actina, prevenendo l'attacco ai filamenti in crescita, in modo da bloccare la polimerizzazione.
- quelli che esibiscono un'attività analoga alle severing proteins.

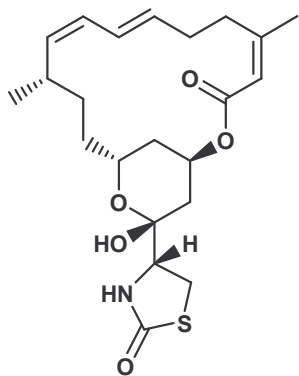
La maggior parte di tali composti esercita, però, effetti molteplici sull'actina, esibendo un profilo di attività più complesso.

Le **citocalasine**,¹⁸ alcaloidi di origine fungina, determinano un rilassamento cellulare (*chàlasis* in greco significa rilassamento). Con un meccanismo analogo alle capping proteins, bloccano la polimerizzazione dei microfilamenti associandosi alle “barbed-ends”. Le molecole più importanti sono la citocalasina B e la citocalasina D. Quest'ultima ha una grande selettività verso l'actina e l'ulteriore proprietà di legare e sequestrare i monomeri e forse anche i dimeri di actina.



citocalasina B

Le **latrunculine**¹⁹ sono macrolidi contenenti un nucleo tiazolidinonico isolati per la prima volta dalla *Latrunculia magnifica*, una spugna del Mar Rosso. Il più potente della classe è la latrunculina A che inibisce la polimerizzazione dell'actina, sequestrando i

**latrunculina A**

con alta affinità ed esplica un'attività di severing sulla F-actina.

Appartengono alla classe dei metaboliti destabilizzanti i microfilamenti anche gli **sfinxolidi** e i **reidispongiolidi** (Schema 2). Essi sono stati isolati nel 1993 dalla *Neosiphonia superstes* e dalla *Reidispongia coerulea*, spugne dell'ordine *Lithistida*, dal gruppo di ricerca coordinato dal prof. Minale.²²

Questi metaboliti sono prodotti da microrganismi simbiotici che convivono con la spugna. Essi sono caratterizzati da un anello macrociclico lattonico a 26 termini e da una catena laterale che presenta una funzione N-metilformilammidica terminale. Tali macrolidi interferiscono con i fasci di filamenti di actina alterandone permanentemente la struttura reticolare e impedendone il successivo riassetto.

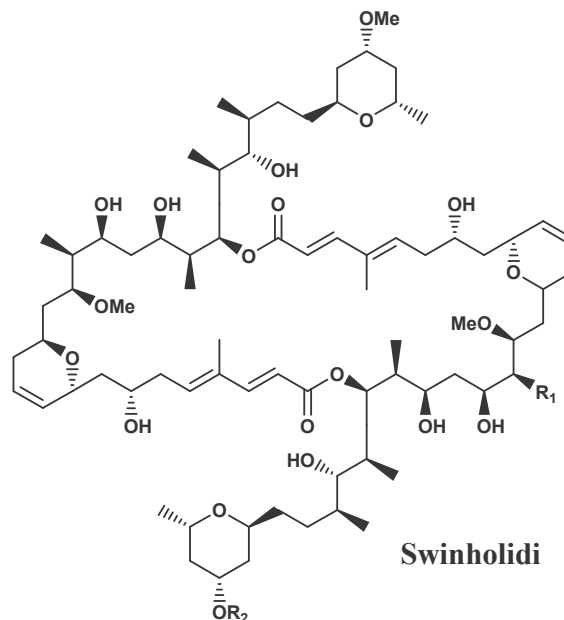
Attraverso uno studio cristallografico, condotto sul complesso actina-G/macrolide, è stato possibile trarre informazioni utili sulle porzioni farmacoforiche di tali molecole e sulla natura delle loro interazioni con i microfilamenti:

- il legame tra l'actina-G e lo sfinxolide è stabilizzato in primo luogo da interazioni di tipo idrofobico. In particolare, la “coda” del macrolide è l'elemento fondamentale per il blocco della crescita del microfilamento.

- L'anello macrociclico inibisce lo scambio dell'ATP con l'ADP distruggendo in tal modo la normale attività ATP-asi. Le sostituzioni sull'anello macrociclico danno luogo a cambiamenti delle strutture cristalline del macrolide determinando effetti negativi sull'attività di capping e severing.

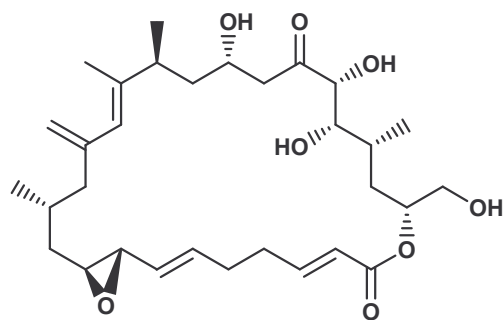
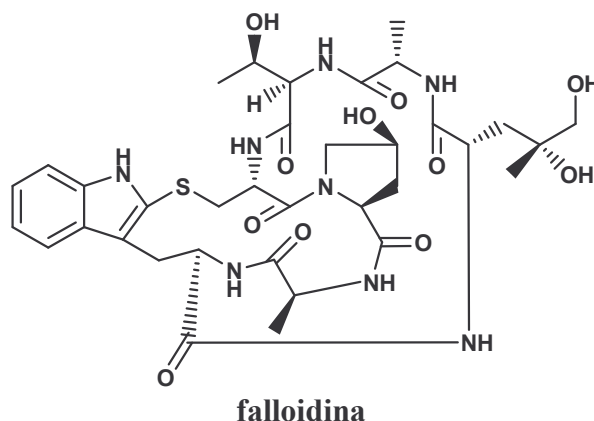
monomeri di G-Actina e inducendo un cambio conformazionale nei microfilamenti che ostacola l'aggiunta di ulteriori unità.²⁰

Il **misakinolide A** e lo **swinholidi A** sono macrolidi isolati dalla spugna *Theonella swinhoei*,²¹ proveniente dal Mar Morto. Il primo esercita un'azione simile a quella delle capping proteins legandosi alle estremità “barbed”. Il secondo lega i dimeri di G-actina

**Swinholidi**

Metaboliti stabilizzanti i microfilamenti

L'eptapeptide biciclico **falloidina**,²⁶ isolato dal fungo *Amanita phalloides*, è sicuramente il più noto dei metaboliti secondari che hanno un effetto stabilizzante sui microfilamenti di actina spostando l'equilibrio verso la forma polimerica d'actina F. Il grosso limite mostrato da questo peptide è la sua non permeabilità alla barriera cellulare, che impedisce una qualsiasi applicabilità in campo farmaceutico.



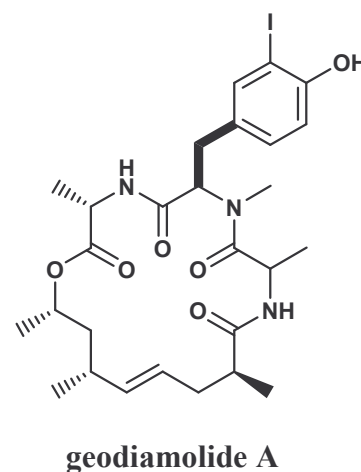
L'**Amphidinolide H**,²⁷ isolato da un dinoflagellato (*Amphidinium*) di un verme piatto di origine marina, è, invece, un macrolide lattonico a 26 termini caratterizzato da una funzione epossidica allilica. Attivo nell'ordine di picogrammi su molte linee cellulari tumorali, si è rivelato capace di stabilizzare l'actina F, secondo quanto suggerito da uno studio di fluorescenza sulla polimerizzazione di

actina marcata con pirenile. La sua peculiarità risiede nella natura covalente del legame che si instaura tra la tirosina 200 del sottodominio 4 dell'actina e la funzione epossidica allilica.

Un caratteristico gruppo di molecole isolate da differenti spugne marine, che hanno mostrato possedere una potentissima attività stabilizzante i microfilamenti è quella dei **CICLODEPSIPEPTIDI**.

Caratterizzati da una porzione peptidica, legata ad un'unità di polipropionato attraverso legami di tipo estereo, presentano spesso unità amminoacidiche modificate (N-metilate, alogenate, di serie sterica D).

Dalle varie specie di spugne del genere *Geodia*, per esempio, sono stati isolati numerosi ciclopepsipeptidi denominati **geodiamolidi**.²⁸ Tali composti presentano un polipropionato legato, attraverso un ponte estereo, all'unità tripeptidica che può contenere amminoacidi quali glicina, alanina, β -tirosina, valina o N-metilalogenotirosina.



Infatti, i vari geodiamolidi si differenziano per la porzione tripeptidica mentre l'unità di polipropionato è quasi sempre costituita da 12 atomi di carbonio e da una insaturazione.

Strutturalmente correlata ai geodiamolidi, è la **Jaspamide** conosciuta anche come Jasplachinolide, isolata nel 1986 da due differenti gruppi di ricerca.²⁹ Il composto è stato originariamente isolato dal porifero *Jaspis splendans* (Fig.7) e poi ritrovato anche in altre spugne marine che includono *Auleta* sp.³⁰, *H. minor*³¹ e *Cymbastela* sp.³²

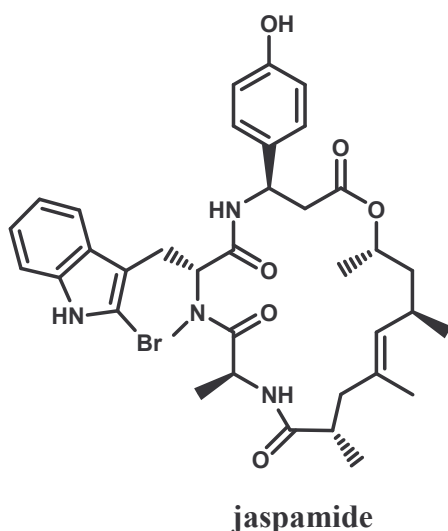


Figura 7. Jaspis splendans

Alla medesima unità di polipropionato riscontrata nei geodiamolidi, sono legati, a partire dal ponte estereo, una (D)- β -tirosina, che conferisce un certo grado di mobilità conformazionale, una (D)-N-metilabrina, e una (L)-alanina. Dall'analisi conformazionale sulla Jaspamide A, integrata da calcoli di meccanica e dinamica molecolari e dati NMR, la mobilità conformazionale del macrolide risulta attribuibile all'unità di tetrapropionato e all'isomero β della tirosina. Il peptide infatti esiste in sei conformazioni favorite, tutte caratterizzate da una cavità per un potenziale legame con ioni metallici.

L'analisi del meccanismo d'interazione col sistema citoscheletrico ha evidenziato come la jaspamide lega l'actina F competitivamente con la falloidina, stabilizza i microfilamenti e ne induce la polimerizzazione.³³ Un importante vantaggio rispetto alla falloidina è però la sua capacità di attraversare facilmente la membrana plasmatica, il che lo rende un ottimo 'probe' per studi cellulari, ma soprattutto un candidato di eccellenza per lo sviluppo di nuovi farmaci da impiegare nella terapia neoplastica.³⁴ L'effetto di stabilizzazione sull'actina-F della jaspamide è stato osservato direttamente in vivo.

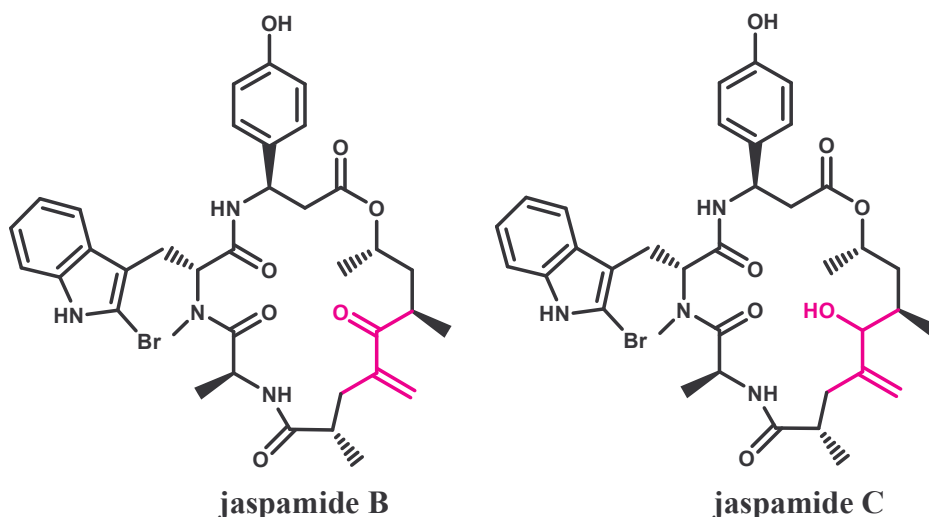
Inoltre, il trattamento di alcune cellule con jaspamide può portare ad una distruzione apparentemente paradossale del citoscheletro di actina, effetto che in vivo è stato attribuito all'aumento del processo di nucleazione "de novo", il che produce come effetto primario la

generazione di masse amorfe di actina-F e la drammatica diminuzione della concentrazione intracellulare di actina-G, insufficiente a svolgere la sua funzione di modellamento e organizzazione delle fibre di actina.

La jaspamide inibisce, inoltre, la protrusione lamellipoidale e la migrazione dei fibroblasti, dove nel trattamento a breve termine si osserva il disassemblaggio di actina-F, mentre nel trattamento a lungo termine si ha il drammatico aumento di masse amorfe.

Studi *in vivo*, hanno anche mostrato la capacità di inibire la crescita di linee cellulari di cancro alla prostata oltre a promettenti attività antifungine, citotossiche, antimicrobiche, insetticide ed antielmintiche.

Analoghi strutturali della jaspamide, la **jaspamide B** e la **jaspamide C** furono isolate dal gruppo di ricerca della prof.ssa Maria Valeria D'Auria e della prof.ssa Angela Zampella dalla spugna *Jaspis splendans* nel 1999.³⁵



Entrambe le molecole differiscono dalla jaspamide nella porzione polichetidica. In particolare la jaspamide B presenta un esometilene, al posto del metile, in posizione 4 oltre ad una funzione chetonica in 5, che è ridotta a funzione ossidrilica nella jaspamide C. Purtroppo questi due nuovi derivati furono isolati in quantità, seppur sufficienti per la loro determinazione strutturale, troppo esigue per procedere all'analisi delle loro potenzialità farmacologiche, soprattutto per quanto riguarda la loro ipotizzata capacità di interferire con le dinamiche del citoscheletro cellulare.

Al fine di isolare nuovi analoghi strutturali della jaspamide e valutarne l'attività farmacologica, la mia attenzione si è concentrata su una recente raccolta della spugna *Jaspis splendans* proveniente dai mari dell'Oceano Pacifico.

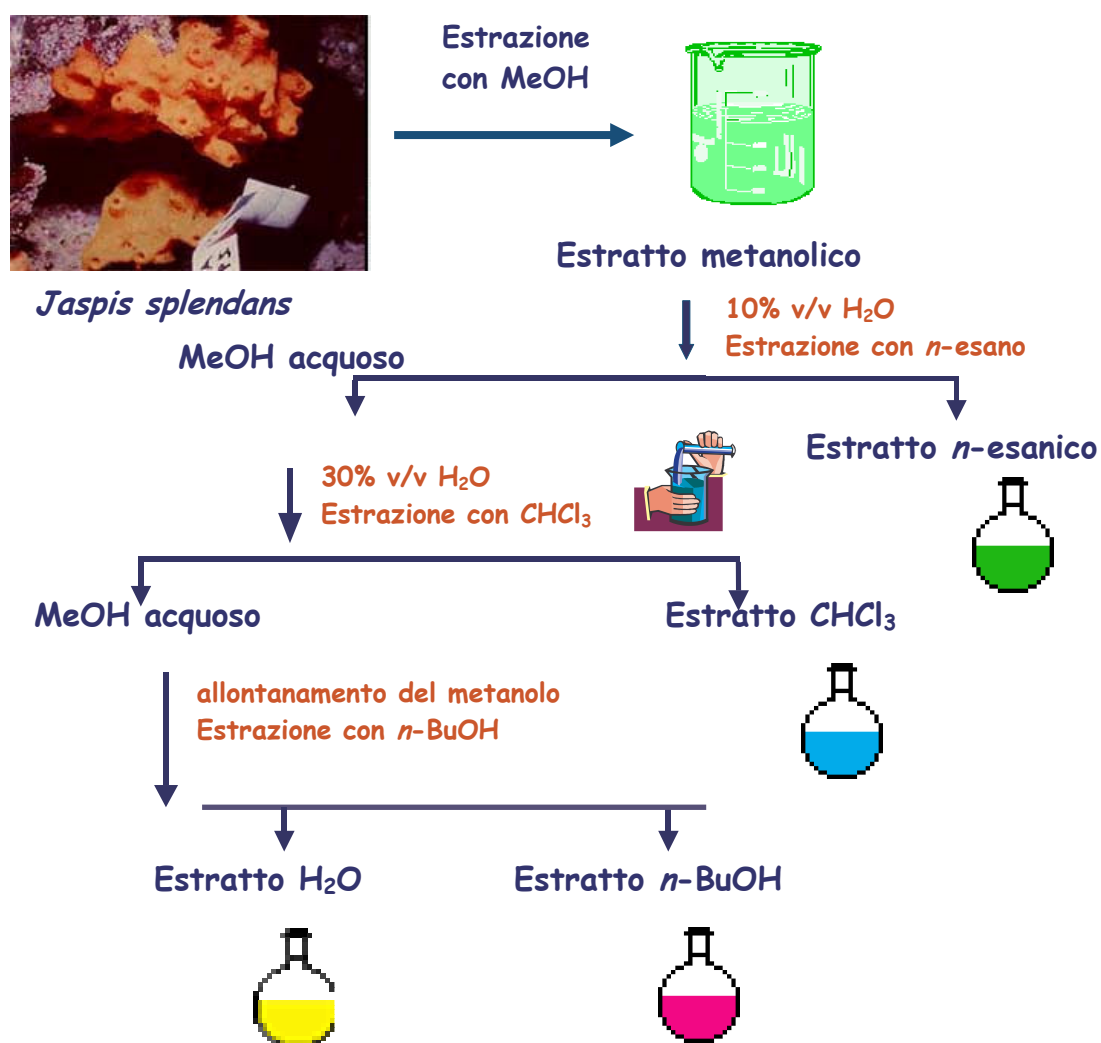
JASPIS SPLENDANS

Oggetto della mia attività di ricerca è stata la spugna *Jaspis splendans* raccolta nei mari della Nuova Caledonia a largo delle isole Vanuatu.

Estrazione ed isolamento

La spugna *Jaspis splendans*, dopo liofilizzazione (360 g), è stata estratta a temperatura ambiente con metanolo (4 x 2.5 L).

Dopo allontanamento del solvente, si sono ottenuti 90 g di residuo solido amorfo, che è stato ripartito secondo una modificata metodica di Kupchan,³⁶ che prevede l'uso di solventi a polarità crescente (*n*-esano, CHCl_3 e *n*-BuOH) (Schema 3).



Schema 3. Metodica di ripartizione secondo Kupchan modificata

- L'estratto metanolico è stato solubilizzato in 1 L di soluzione MeOH:H₂O (90:10) e ripartito per tre volte con 500 ml di *n*-esano nel quale si concentrano le sostanze più lipofile, ottenendo 910 mg di estratto esanico.
- La fase metanolica residua è stata arricchita in acqua (30% v/v) ed estratta per tre volte con 500 ml di CHCl₃, ottenendo così un estratto ricco di sostanze a media polarità, nella quantità di 3.2 g.
- Successivamente, la fase acquosa residua è stata concentrata a pressione ridotta al fine di allontanare il metanolo ed è stata ripartita per tre volte con 500 ml di *n*-butanolo, nel quale si concentrano le sostanze più polari, ottenendo 2.2 g di estratto.

L'estratto cloroformico (3.2 g), è stato frazionato mediante MPLC (cromatografia liquida a media pressione) utilizzando una colonna cromatografica di gel di silice che è stata impaccata con CH₂Cl₂ ed eluita con un gradiente CH₂Cl₂/MeOH 0-10%.

Le frazioni 4 (eluita con MeOH/CH₂Cl₂ 5:95) 5 (7:93) e 6, (10:90), sono state ulteriormente purificate mediante HPLC usando una colonna semipreparativa µ-Bondapak™ C₁₈ a fase inversa e come eluente una miscela MeOH/H₂O (65:35).

Dai cromatogrammi si è evidenziato sempre solo un picco (rt = 20.0 min.) la cui identità è stata attribuita alla **jaspamide** (96.4 mg), per semplice confronto dei suoi dati ¹H-NMR con quelli riportati in letteratura.

Le linee di base dei tracciati cromatografici sono state raccolte ed ulteriormente purificate tramite HPLC utilizzando una colonna analitica LUNA C₁₈ Phenomenex (3µ ed una miscela eluente MeOH/H₂O (65:35). Sorprendentemente questa volta il tracciato cromatografico mostrava, insieme al picco attribuito alla jaspamide (rt = 41.0 min.), anche altri picchi con differenti r.t.

Tutti i picchi sono stati raccolti ed analizzati mediante un'analisi combinata degli spettri NMR, monodimensionali (¹H e ¹³C-NMR) e bidimensionali (COSY, HMBC, HSQC e ROESY), e della spettrometria di massa ESI ad alta risoluzione.

È stato possibile, in tal modo, caratterizzare strutturalmente undici nuovi analoghi strutturali della jaspamide A suddivisibili in due classi: analoghi con modifiche nella porzione tripeptidica ed analoghi con modifiche nella porzione di polipropionato.

Al primo gruppo appartengono le **jaspamidi D ed E** caratterizzate dalla sostituzione del residuo di alanina rispettivamente con acido α-ammino butirrico e serina ed altre quattro jaspamidi (**K, L, M, N**) che presentano, invece, modifiche sul residuo di N-metil bromotriptofano. Il primo di questi è distinto dalla presenza di un gruppo ossidrilico sul metilene della catena laterale del triptofano, mentre il secondo dall'assenza del metile sull'N

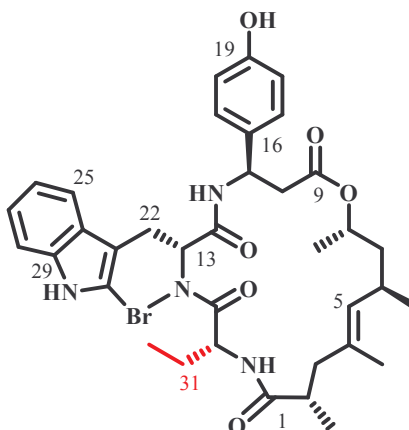
amminioacidico. Negli ultimi due è, invece, evidente un profondo riarrangiamento dell'unità di triptofano che porta alla formazione in un caso di un nucleo di chinurenina ed in un altro di un nucleo benzossazinonico.

Cinque (jaspamidi **F**, **G**, **H**, **I**, **J**), invece, sono i nuovi analoghi con modifiche nella catena di polipropionato. Le jaspamidi J, F e H si differenziano per l'assenza di un metile rispetto alla jaspamide capostipite rispettivamente nelle posizioni 2, 4 e 6.

La jaspamide I è caratterizzata dalla presenza di un ossidrile in posizione 3, mentre la jaspamide G dalla sostituzione del metile in posizione 4 con un gruppo aldeidico e contestuale modificazione configurazionale del doppio legame sempre in posizione 4.

Oltre agli undici nuovi analoghi sono stati isolati anche le già note jaspamide B e jaspamide C di cui però non esistevano in letteratura dati di citotossicità.

Saggi specifici effettuati su linee cellulari MCF-7, HT-29, e A10 presso il Dipartimento di Scienze farmaceutiche della South Caroline Medical University hanno evidenziato che tutte le jaspamidi isolate presentano una notevole citotossicità causata dalla disaggregazione del sistema microfilamentoso mentre la struttura microtubulare resta completamente inalterata.

Jaspamide D

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide D, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 723.2757 ($M+H$)⁺ attribuito alla formula molecolare C₃₇H₄₇BrN₄O₆.

Paragonata alla formula molecolare della jaspamide, si osservava la presenza di un CH₂ addizionale.

L'analisi dello spettro ¹H-NMR ha indicato chiaramente che le risonanze relative all'unità di polipropionato della jaspamide D erano sovrapponibili a quelle della jaspamide di riferimento, suggerendo così che la modifica doveva risiedere nella porzione tripeptidica.

In particolare nello spettro protonico mancava il segnale doppietto a δ_H 0.70, attribuito al metile del residuo di alanina, mentre era presente il segnale del protone legato al C- α di questo stesso residuo (δ_H 4.74), suggerendo una modifica strutturale di queste unità.

In aggiunta lo spettro ¹H-NMR ha mostrato la presenza di un metile tripletto addizionale a campi alti (δ_H 0.11) e di due segnali rispettivamente a δ_H 1.06 e δ_H 1.59 integranti ciascuno per un protone.

La definizione strutturale dell'unità di polipropionato e della porzione tripeptidica è stata realizzata attraverso l'analisi puntuale di un esperimento 2D-COSY e di un esperimento di correlazione eteronucleare ¹H-¹³C-HSQC.

L'assegnazione di tutte le risonanze relative alla porzione polichetidica e ai residui di β -tirosina e N-metilbromotriptofano è stata fortemente agevolata in considerazione dell'ottima sovrapposizione con quelle riportate in letteratura.

Per quanto riguarda il residuo aminoacidico presente al posto dell'unità di alanina, l'interpretazione dell'esperimento COSY, in combinazione con l'HSQC, è stata risolutiva. In particolare, si è osservato che il segnale tripletto a δ_H 0.11 correlava con i due protoni a δ_H 1.06 e δ_H 1.59, a loro volta correlati con un protone aminoacidico a δ_H 4.79. Quest'ultimo

inoltre, correlava con un segnale doppietto a δ_H 6.53, attribuito, in base a considerazioni di *chemical shift*, ad un protone su azoto.

Di contro, nello spettro HSQC, il segnale tripлетto è stato agevolmente assegnato ad un atomo di carbonio di tipo metilico (δ_C 7.07), mentre si osservava che i due segnali a δ_H 1.06 e δ_H 1.59 correlavano con lo stesso atomo di carbonio a δ_C 24.4.

La presenza di un metilene diasterotopico scalarmente accoppiato con un metile schermato e con un $-CH$ deschermato, ha suggerito la presenza nella jaspamide D di un residuo di acido α -aminobutirrico (ABA).

Dobbiamo sottolineare che la jaspamide D rappresenta il primo esempio di ciclodepsipeptide correlato ai geodiamolidi e alla jaspamide stessa, a presentare l'insolito residuo ABA.

L'assegnazione dei carboni carbonilici, come pure la determinazione della sequenza, è stata effettuata attraverso l'analisi di uno spettro di correlazione 1H - ^{13}C "long range"/HMBC, e le correlazioni chiave sono mostrate in figura 8.

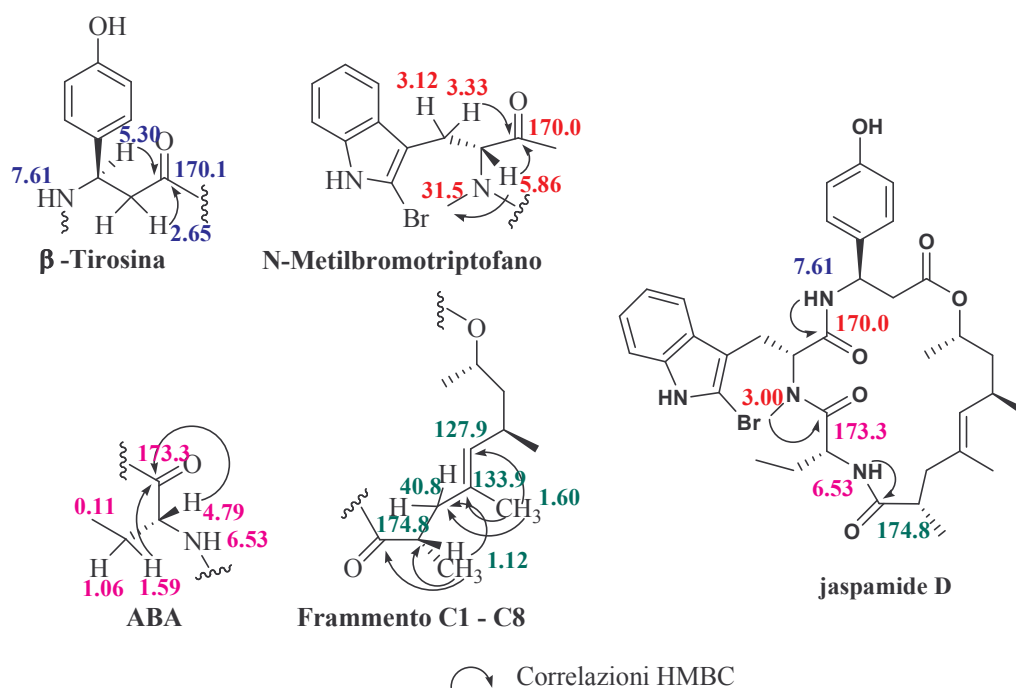


Figura 8. Sistemi di spin 1H -NMR e ^{13}C -NMR della jaspamide D

In particolare, la presenza di un "cross-peak" tra il protone a δ_H 5.86 attribuito al C- α del triptofano e il metile singoletto a δ_C 31.5, indicava la presenza di un'unità di N-metilbromotriptofano.

Inoltre la correlazione dell'-NH a δ_H 6.53 con il carbonile a δ_C 174.8 stabiliva il legame ammidico tra l'unità di polipropionato e il residuo di ABA. Quest'ultimo era legato all'unità di N-metilbromotriptofano come risultava dalla presenza di una correlazione HMBC tra i protoni del metile su azoto (δ_H 3.00) con il carbonio carbonilico a δ_C 173.3, precedentemente assegnato all'unità di acido α -aminobutirrico.

Come nelle jaspamidi, la porzione tripeptidica terminava con l'unità di β -tirosina che coinvolgeva il suo carbonio acilico nella chiusura del ciclo tramite un legame estereo con l'atomo di ossigeno legato al C-8 della porzione polichetidica ed il suo NH nella formazione del legame peptidico con il residuo di N-metilbromotriptofano, come dimostrato dal cross-peak tra l' NH a δ_H 7.61 e il carbonile a δ_C 170.0..

Fase successiva è stata la determinazione della stereochimica dei centri stereogenici presenti nella jaspamide D.

Per quanto riguarda la porzione di polipropionato, dobbiamo sottolineare che esiste una sovrapposizione sostanzialmente teorica dei valori di tutte le risonanze protoniche e ^{13}C della jaspamide D con quelli riportati per la jaspamide di riferimento, suggerendo che gli stereocentri presenti in questa porzione hanno le stesse configurazioni relative in entrambe le molecole.

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi un approccio largamente utilizzato prevede l'applicazione del metodo di Marfey.³⁷ Questo metodo consiste nella derivatizzazione di amminoacidi derivati dall'idrolisi acida del peptide intatto con un reattivo chirale, l'1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninammide (L-FDAA) e il confronto dei tempi di ritenzione in HPLC degli amminoacidi presenti nel peptide così derivatizzati con i tempi di ritenzione dei corrispondenti standard D e L derivatizzati con lo stesso reattivo.

Nonostante i numerosi vantaggi di tale metodo, rappresentati principalmente dall'elevata semplicità operativa e dal basso costo, esso presenta però un grosso limite. Infatti, il metodo di Marfey non ha un'applicabilità universale dal momento che può essere determinata la serie sterica solo per amminoacidi convenzionali, per i quali si dispone di standard.

Per questa ragione non è stato possibile definire la serie sterica della β -tirosina, un aminoacido non ribosomiale, per il quale non è disponibile in commercio un adeguato standard.

Altro problema è stato, inoltre, rappresentato dall'unità di N-metilbromotriptofano, essendo ben nota la straordinaria labilità di questo residuo nelle condizioni drasticamente acide utilizzate nella fase di idrolisi del peptide prevista dal metodo di Marfey.

Lo studio della letteratura, ha però poi evidenziato la capacità di entrambi gli amminoacidi di degradarsi, per trattamento con ozono seguito da work-up ossidativo (acqua ossigenata), rispettivamente ad acido aspartico e acido N-metilaspartico e tale reattività è risultata interessante per un possibile uso del metodo di Marfey (Fig.9). La jaspamide A è stata, infatti, prima ozonizzata in MeOH dry per 2h, trattata con H₂O₂, e successivamente idrolizzata 'overnight' in ambiente acido, liberando acido aspartico e acido metilaspartico che sono stati derivatizzati separatamente con L-FDAA e D-FDAA. La jaspamide D è stata anch'essa ozonizzata (Fig.9) e idrolizzata e infine, i residui amminoacidici ottenuti sono stati derivatizzati con L-FDAA (Fig.10).

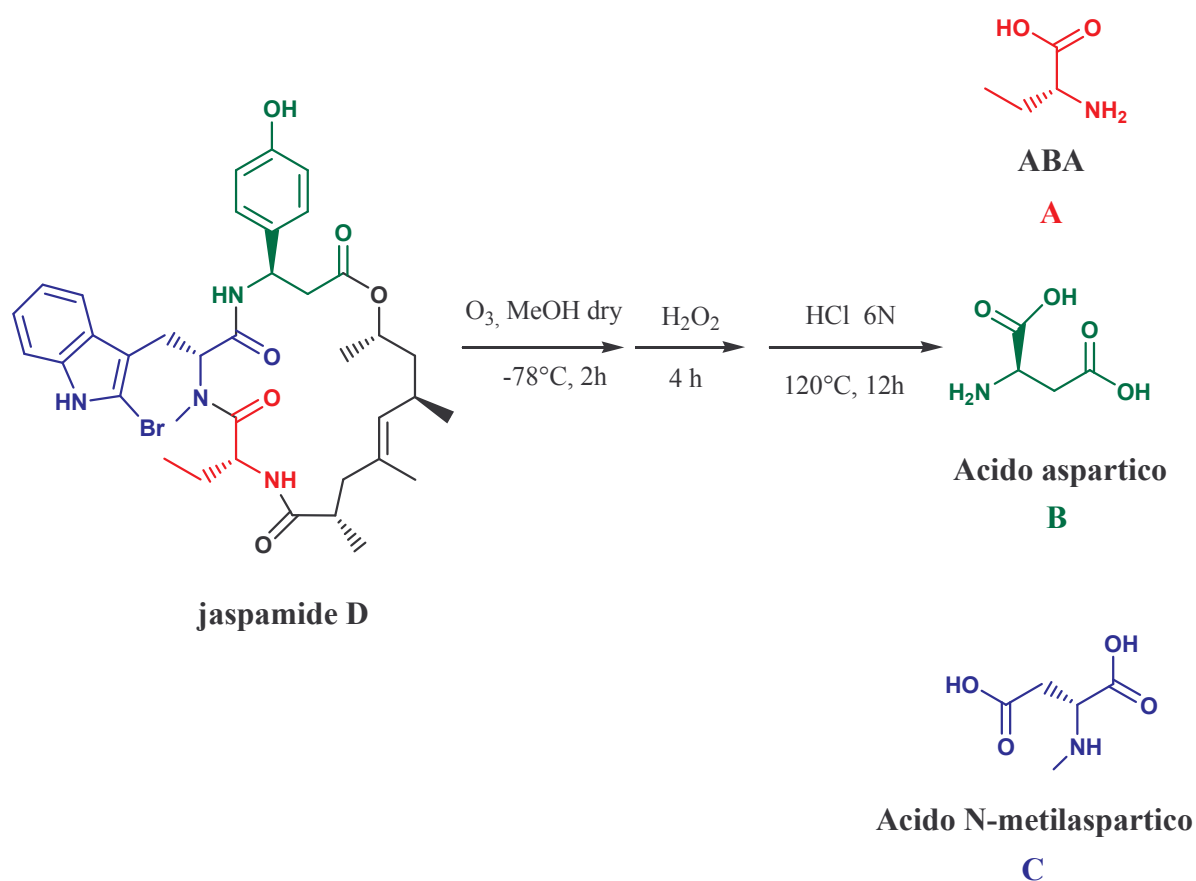


Figura 9. Ozonolisi ed idrolisi della jaspamide D

Si è provveduto poi al confronto dei tempi di ritenzione in LC/MS degli amminoacidi derivatizzati per poter assegnare la stereochimica assoluta ai residui di β -tirocina e N-metilbromotriptofano.

L'analisi LC/MS condotta monitorando lo ione a m/z 385.9 corrispondente a Asp-FDAA-H⁺ ha condotto ai seguenti risultati:

Jasp.A - D-Asp-L-FDAA	rt= 16.77
Jasp.A - D-Asp-D-FDAA	rt= 15.61
Jasp.D - Asp-L-FDAA	rt= 16.90

Da questi dati, si deduce **che la serie sterica del residuo di β -tirosina nella jaspamide D è uguale a quella della jaspamide capostipite cioè D.**

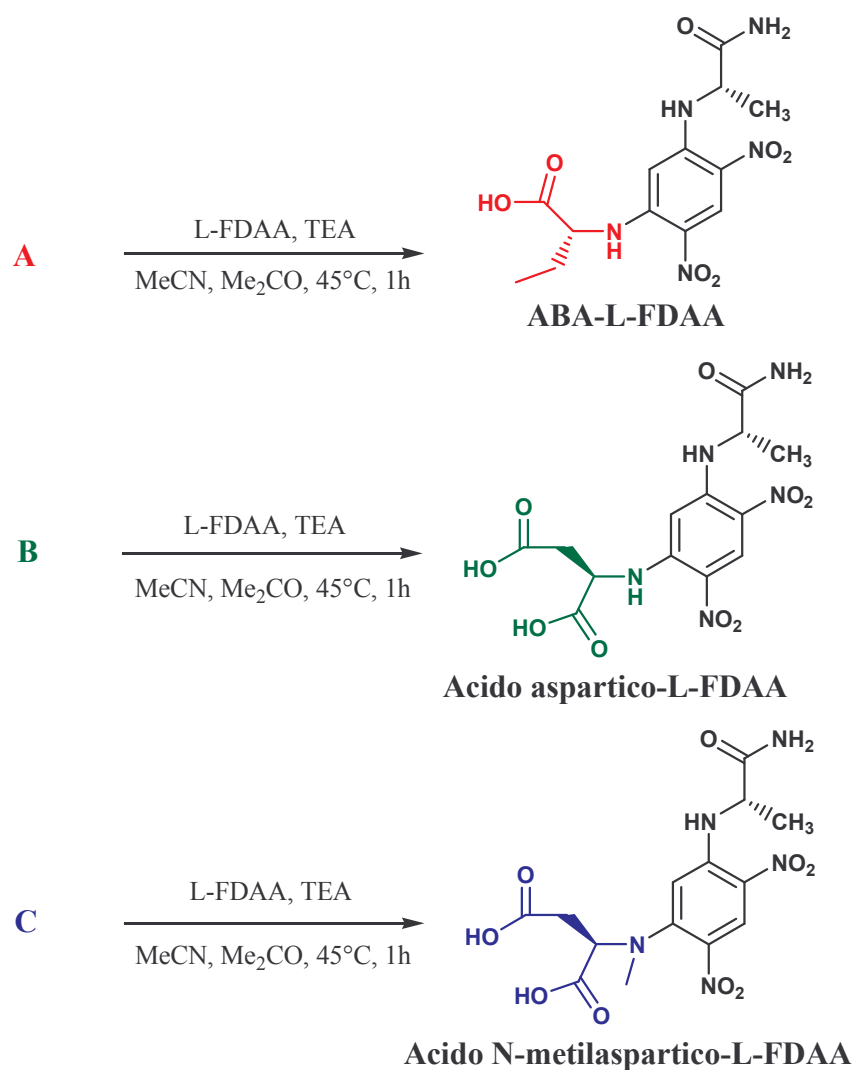


Figura 10: Derivatizzazione con L-FDAA

L'analisi LC/MS condotta monitorando lo ione a m/z 399.9 corrispondente a MeAsp-FDAA-H⁺ ha condotto, invece ai seguenti risultati:

Jasp.A - D-MeAsp-L-FDAA	rt= 14.04
Jasp.A - D-MeAsp-D-FDAA	rt= 16.35
Jasp.D - MeAsp-L-FDAA	rt= 14.16

Da questi dati, si deduce che la **serie sterica del residuo di N-metilbromotriptofano** nella jaspamide D è uguale a quella della jaspamide, cioè **D**.

Per la definizione della serie sterica dell'unità di ABA (acido α -aminobutirrico), è stato applicata la versione LC/MS del metodo di Marfey.

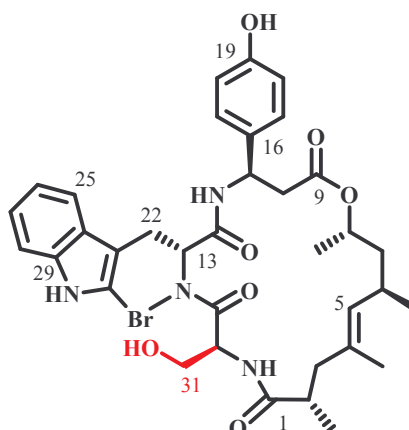
In particolare la jaspamide D è stata sottoposta ad idrolisi acida con HCl 6N per liberare il residuo di ABA, che è stato poi derivatizzato con il reattivo chirale D-FDAA. Contemporaneamente una piccola aliquota di D-ABA, commercialmente disponibile, è stata derivatizzata in due vials separate con L- e D-FDAA.

L'analisi LC / MS condotta monitorando lo ione a m/z 356 corrispondente alla ABA-FDAA- H^+ ha prodotto i seguenti risultati:

D-ABA / L-FDAA	rt = 25.66 min.
D-ABA / D-FDAA	rt = 20.10 min.
Jaspamide D / D-FDAA	rt = 20.05 min.

Da questi dati, si deduce che **la serie sterica del residuo di ABA** nella jaspamide D è **D**.

La conferma inequivocabile è derivata dalla coeluizione ABA-FDAA ottenuto dalla jaspamide D con lo standard D-ABA derivatizzato con D-FDAA a rt = 20.10 min.

Jaspamide E

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide E, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, mostrava uno ione pseudomolecolare a m/z 725.2550 $(M+H)^+$ attribuito alla formula molecolare $C_{36}H_{45}BrN_4O_7$.

Paragonata alla formula molecolare della jaspamide , si osservava la presenza di 16 u.m.a. in più.

L'analisi dello spettro 1H -NMR indicava chiaramente che le risonanze relative all'unità di polipropionato della jaspamide E erano sovrapponibili a quelle della jaspamide di riferimento, suggerendo così che la modifica doveva risiedere nella porzione tripeptidica. In particolare nello spettro protonico mancava il segnale doppietto a δ_H 0.70, attribuito al metile del residuo di alanina, mentre era presente il segnale del protone legato al C- α di questo stesso residuo (δ_H 4.76), ciò suggerendo una modifica strutturale di queste unità.

In aggiunta lo spettro 1H -NMR mostrava la presenza di due segnali a δ_H 3.13 e δ_H 3.21 diagnostici della presenza di un metilene legato ad ossigeno.

La definizione strutturale dell'unità di polipropionato e della porzione tripeptidica è stata realizzata attraverso l'analisi puntuale di un esperimento 2D-COSY e di un esperimento di correlazione eteronucleare 1H - ^{13}C -HSQC e 1H - ^{13}C -HMBC.

L'assegnazione di tutte le risonanze relative alla porzione polichetidica e ai residui di β -tirosina e N-metilbromotriptofano è stata fortemente agevolata in considerazione dell'ottima sovrapposizione con quelli riportati in letteratura.

Per quanto riguarda la porzione modificata, lo studio dei dati NMR mono e bidimensionale e di spettrometria di massa hanno permesso di definire la presenza di un residuo aa di serina.

Dallo spettro 2D-COSY è evidente la correlazione del protone a δ_H 4.76 del C α oltre che con il protone a δ_H 6.87 dell' NH amminoacidico anche con i due segnali a δ_H 3.13, δ_H 3.21 caratteristici della jaspamide E.

Dall'analisi 1H - ^{13}C -HSQC, inoltre, si notava la correlazione del protone a δ_H 4.76 con un C a δ_C 54.4 tipico dei C- α aa e la correlazione dei due protoni a δ_H 3.13, δ_H 3.21 con un carbonio a δ_C 65.5 valore diagnostico per un C legato ad ossigeno. Tali dati associati al valore di 16 u.m.a. in più rispetto alla jaspamide permetteva di stabilire la presenza di un gruppo CH_2OH legato al C α ovvero, la sostituzione nella jaspamide E dell' alanina con la serina.

L'assegnazione dei carboni carbonilici, come pure la determinazione della sequenza, è stata effettuata attraverso l'analisi di uno spettro di correlazione 1H - ^{13}C "long range"/HMBC, e le correlazioni chiave sono mostrate in figura 11.

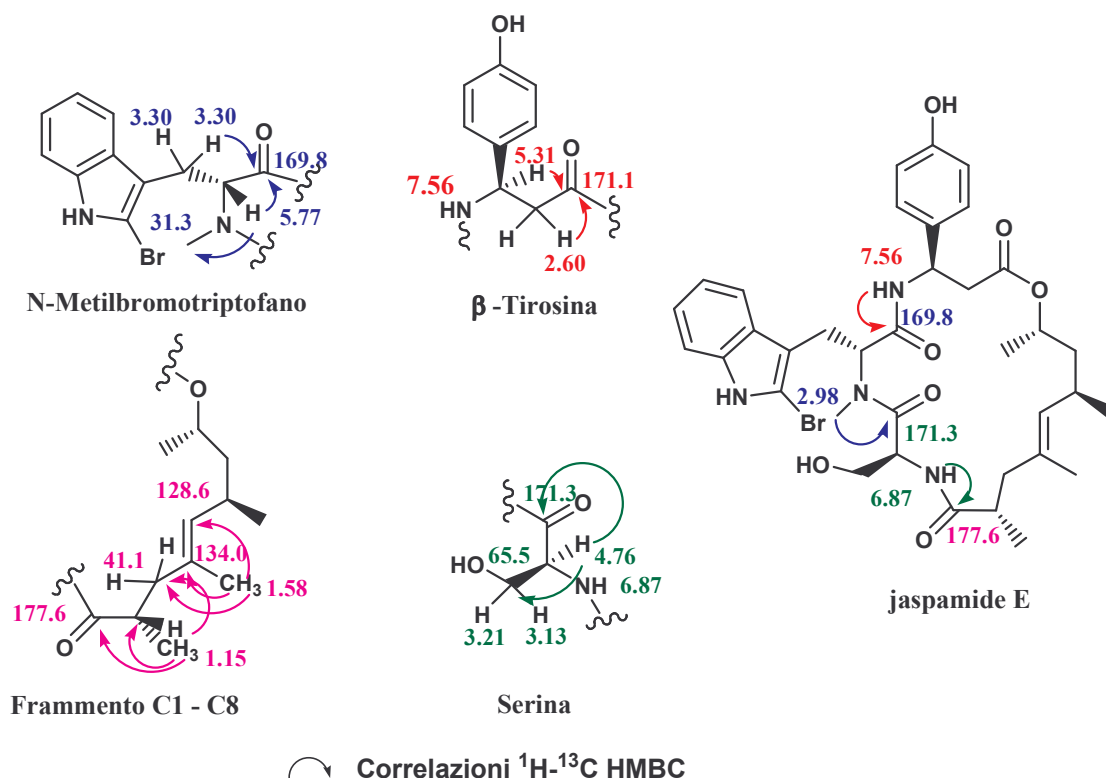


Figura 11. Sistemi di spin 1H -NMR e ^{13}C -NMR della jaspamide E

In particolare, la presenza di un "cross-peak" tra il protone a δ_H 5.77 attribuito al C- α del triptofano e il metile singoletto a δ_C 31.3, indicava la presenza di un'unità di N-metilbromotriptofano. Il residuo di β tirosina, la cui presenza è evidenziata dai "cross-peak" tra il carbonile a δ_C 171.1 con i protoni in β a δ_H 5.31 e in α δ_H 2.60, è legato all' N-metilbromotriptofano tramite un legame ammidico, come si evince dal picco di correlazione

tra il carbonile a δ_C 169.8 con il protone dell' NH a δ_H 7.56 ed alla catena di polipropionato C-8 tramite un legame estereo

I dati 1H - ^{13}C "long range"/ HMBC hanno permesso di confermare anche la presenza della serina come si evince dalle correlazioni tra il protone a δ_H 4.76 con il carbonio carbonilico a δ_C 171.3 e il metilene in catena laterale a δ_C 65.5.

Lo stesso residuo di serina chiude il ciclo tramite due legami ammidici con l' N-metilbromotriptofano (correlazione tra il metile su N con δ_H 2.98 e il carbonile δ_C 171.3) e il carbonile della catena di polipropionato C-8 (correlazione tra il protone su N con δ_H 6.87 e il carbonile δ_C 177.6).

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi, come già fatto per la jaspamide D è stato deciso di applicare il metodo di Marfey. Data l' impossibilità di poter applicare tale metodo per la β -tirosina e per l'N-metilbromotriptofano si è deciso di sfruttare la capacità di entrambi gli amminoacidi di degradarsi, in presenza di ozono, rispettivamente ad acido aspartico e acido N-metilaspartico, così come già descritto per la jaspamide D. Anche in questo caso si è dedotto che la serie sterica del residuo di N-metilbromotriptofano e β -tirosina nella jaspamide E è uguale a quella della jaspamide, cioè D.

Anche per la definizione della serie sterica dell'unità di serina, abbiamo applicato la versione LC/MS del metodo di Marfey.

In particolare, la jaspamide E è stata sottoposta ad idrolisi acida con HCl 6N per liberare il residuo di serina, che è stato poi derivatizzato con il reattivo chirale D-FDAA.

Contemporaneamente una piccola aliquota di L-Serina, commercialmente disponibile, è stata derivatizzata in due vials separate con L- e D-FDAA.

L'analisi LC / MS condotta monitorando lo ione a m/z 357.9 corrispondente alla Ser-FDAA- H^+ ha prodotto però risultati per nulla soddisfacenti.

I tempi di ritenzione di L-Ser-L-FDAA e L-Ser-D-FDAA risultavano, infatti, essere molto simili e la coiniezione dei due campioni standard sviluppava un unico picco allargato il che evidenziava come il metodo di Marfey fosse del tutto inapplicabile per l'aa serina. Per superare tale difficoltà si è deciso di ricorrere all'uso dell'estere metilico della serina come standard da derivatizzare separatamente con L- e D-FDAA.

Il residuo aa di serina ottenuto per idrolisi acida della jaspamide E è stato, invece, prima fatto reagire con diazometano per ottenere il corrispondente estere metilico e successivamente derivatizzato con D-FDAA.

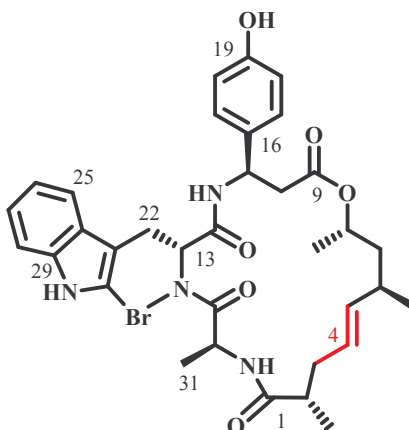
L'analisi LC / MS condotta monitorando lo ione a m/z 371.9 corrispondente alla Serina metilestere -FDAA- H^+ ha condotto ai seguenti risultati:

L-Serina metilestere-L-FDAA	rt= 18.06
L-Serina metilestere-D-FDAA	rt= 14.70
Jasp. Serina metilestere- D-FDAA	rt=14.57

Da questi dati, si deduce che la **serie sterica del residuo di serina** nella jaspamide E è **L**.

La conferma inequivocabile è derivata dalla coeluizione di Serina metilestere-FDAA ottenuto dalla jaspamide E con lo standard L-Serina metilestere derivatizzato con D-FDAA a $rt = 14.65$ min.

Per quanto riguarda la porzione di polipropionato, invece, dobbiamo sottolineare che esiste una sovrapposizione sostanzialmente teorica dei valori di tutte le risonanze protoniche e ^{13}C della jaspamide E con quelli riportati per la jaspamide di riferimento. Ciò suggerisce che gli stereocentri presenti in questa porzione hanno le stesse configurazioni relative in entrambe le molecole.

Jaspamide F

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide F, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 695.2444 $(M+H)^+$ attribuito alla formula molecolare $C_{35}H_{43}BrN_4O_6$.

Tale spettro di massa, confrontato con quello jaspamide, ha rivelato la presenza di 14 u.m.a. in meno.

L'analisi dello spettro 1H -NMR ha indicato chiaramente che i valori di chemical shift relativi alla porzione tripeptidica della jaspamide F sono sovrapponibili a quelli della jaspamide A di riferimento, suggerendo così che la modifica risiede nell'unità di polipropionato.

Lo spettro protonico evidenzia l'assenza del segnale a δ_H 1.60, attribuito al metile in posizione 4 della jaspamide A. Inoltre sempre nello spettro protonico si evidenziava la scomparsa del doppietto a δ_H 6.37, diagnostico del protone in 5, e la contemporanea presenza di due nuovi segnali a δ_H 5.22 e δ_H 5.42 che risuonano rispettivamente come doppio doppietto e doppio tripletto.

Dall'analisi dello spettro di correlazione eteronucleare diretta 1H - ^{13}C -HSQC tali protoni risultano essere accoppiati con due carboni a δ_C 126.9 e δ_C 135.1 valori tipici di carboni olefinici.

Lo spettro di correlazione 1H - 1H COSY (Fig.12) evidenziava importanti cross-peaks tra l' 1H -4 a δ_H 5.42 con i due protoni diastereotopici in posizione 3 a δ_H 1.92 e δ_H 2.36 e soprattutto tra lo stesso H-4 con l' 1H -5 a δ_H 5.22 che a sua volta correlava con il protone H-6 a δ_H 1.90.

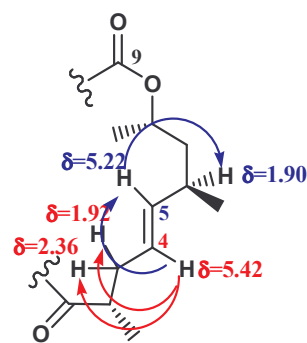


Figura 12. Correlazioni 1H - 1H COSY

Lo spettro di correlazione ^1H - ^{13}C long-range (HMBC) (Fig.13) ha poi permesso di confermare la catena polichetidica come acido 8-idrossi-2,6-dimetilnon-4-enoico. Diagnostici a tal proposito sono i picchi di correlazioni J^3 dell' ^1H -5 a δ_{H} 5.22 con il C-7 a δ_{C} 41.8 e tra l' ^1H -4 a δ_{H} 5.42 con il C-2 a δ_{C} 42.0.

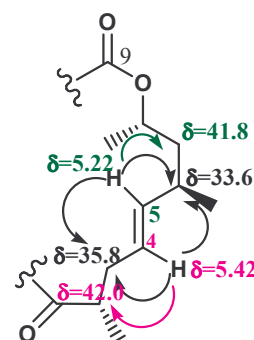


Figura 13. Correlazioni HMBC

L'identificazione dei residui aminoacidici di β -tirosina, N-metilbromotriptofano e alanina, è stata effettuata mediante paragone dei dati ^1H e ^{13}C NMR della jaspamide F con quelli riportati in letteratura. L'assegnazione dei carboni carbonilici, e la determinazione della sequenza aminoacidica, è stata effettuata attraverso l'analisi dello spettro di correlazione ^1H - ^{13}C HMBC, e le correlazioni chiave sono mostrate nella figura 14.

La presenza della β -tirosina, è stata confermata dall'analisi dello spettro HMBC in cui compaiono due cross-peaks tra il carbonile a δ_{C} 170.2 ed il protone in α a δ_{H} 2.68 e tra lo stesso carbonile ed il protone in β a δ_{H} 5.22.

Per quanto riguarda l' N -metilbromotriptofano, nello spettro HMBC sono presenti picchi di correlazione tra il protone α del triptofano a δ_{H} 5.76 ed il carbonio N -metilico a δ_{C} 31.0 ed il carbonio carbonilico a δ_{C} 168.9. Sempre nello spettro HMBC, è presente un picco di correlazione tra il carbonile a δ_{C} 168.9, relativo al residuo di N -metilbromotriptofano, ed il protone dell' NH a δ_{H} 7.68 relativo al residuo di β -tirosina. Ciò ha indicato che i due aminoacidi sono legati in sequenza tra loro.

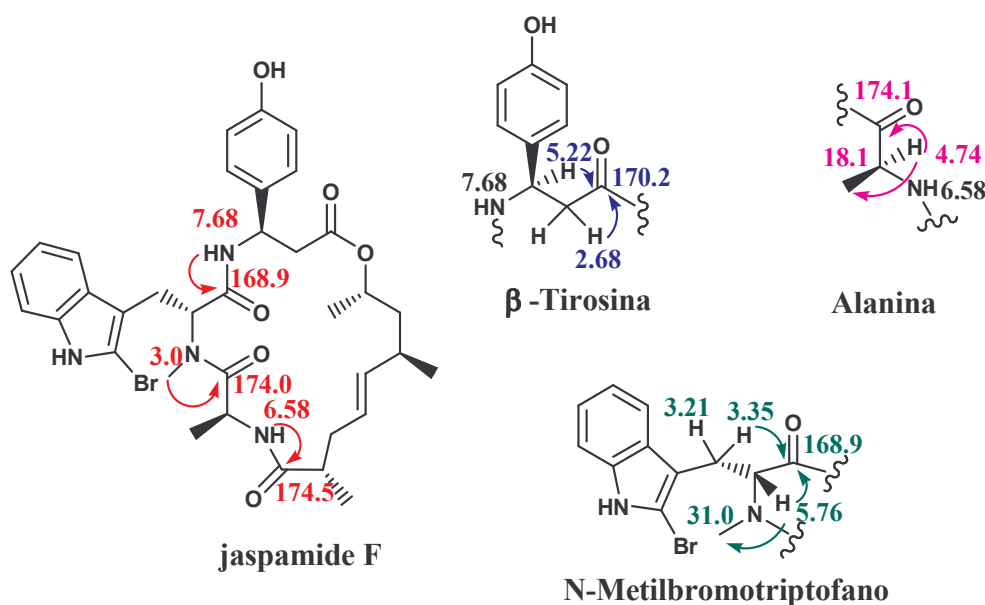


Figura 14. Correlazioni ^1H - ^{13}C HMBC

La presenza dell'alanina, si evince, invece, dalle correlazioni tra il protone a δ_H 4.74 ed il carbonio carbonilico a δ_C 174.1 e tra lo stesso protone ed il metile in catena laterale a δ_C 18.1. Il residuo di alanina risulta essere legato sia all'N-metilbromotriptofano che alla catena di polipropionato. Infatti, nello spettro HMBC, è presente sia un picco di correlazione tra il metile sull'N dell'N-metilbromotriptofano a δ_H 3.0 ed il carbonile dell'alanina a δ_C 174.0, sia un picco di correlazione tra il protone sull'N a δ_H 6.58 dell'alanina ed il carbonile a δ_C 174.5 in posizione C-1 della catena.

Passo successivo alla caratterizzazione strutturale della jaspamide F, è stata la definizione della stereochimica della catena di polipropionato e della porzione amminoacidica. La configurazione del doppio legame in posizione 4 (Figura.15) è stata definita dal valore della costante di accoppiamento tra il protone 4 ed il protone 5. Il valore molto alto ($J_{4,5}=15.6$ Hz) riscontrato ha permesso di stabilire come *E* la configurazione del doppio legame in questione. Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi, come già fatto per la jaspamide D è stato deciso di applicare il metodo di Marfey. Data l'impossibilità di poter applicare tale metodo per la β -tirosina e per l'N-metilbromotriptofano si è deciso di sfruttare la capacità di entrambi gli amminoacidi di degradarsi, in presenza di ozono, rispettivamente ad acido aspartico e acido N-metilaspartico, così come già descritto per la jaspamide D. Anche in questo caso si è dedotto che **la serie sterica del residuo di N-metilbromotriptofano e β -tirosina** nella jaspamide F è uguale a quella della jaspamide, cioè **D**. Anche per la definizione della serie sterica dell'unità di alanina, è stata applicata la versione LC/MS del metodo di Marfey. In particolare, la jaspamide F è stata sottoposta ad idrolisi acida con HCl 6N per liberare il residuo di alanina, che è stato poi derivatizzato con il reattivo chirale L-FDAA.

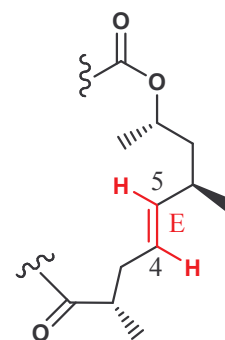


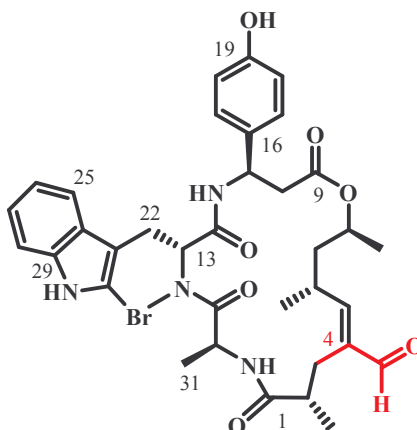
Figura 15. Configurazione *E*

Contemporaneamente, una piccola aliquota di L-alanina, commercialmente disponibile, è stata derivatizzata separatamente con L- e D-FDAA.

L'analisi LC/MS condotta monitorando lo ione a m/z 357.9 corrispondente alla Ala-FDAA-H⁺ ha condotto ai seguenti risultati:

Jasp.A – L-Ala-L-FDAA	rt= 16.60
Jasp.A – L-Ala-D-FDAA	rt= 18.90
Jasp.F – Ala-L-FDAA	rt= 16.60

Da questi dati, si deduce che la **serie sterica del residuo di alanina è L**.

Jaspamide G

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide G, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 723.2393 ($M+H$)⁺ attribuito alla formula molecolare C₃₆H₄₄BrN₄O₇.

Paragonata alla formula molecolare della jaspamide, si è osservato la presenza di 14 u.m.a. in più.

L'analisi dello spettro ¹H-NMR ha indicato chiaramente che i valori di chemical shift relativi alla porzione tripeptidica della jaspamide G sono sovrapponibili a quelli della jaspamide di riferimento, suggerendo così che la modifica risiede nell'unità di polipropionato.

In particolare, nello spettro protonico è risultata evidente la presenza di un singoletto a δ_H 9.30 diagnostico di un protone aldeidico e la contemporanea assenza del metile in 4 a δ_H 1.56.

Dall'analisi dello spettro di correlazione eteronucleare diretta ¹H-¹³C-HSQC tale protone risulta essere accoppiato con un carbonio a δ_C 196.2 indicando così la presenza di un gruppo aldeidico.

La conferma della presenza di tale gruppo si è avuta mediante

l'analisi dello spettro di correlazione ¹H – ¹³C HMBC nel quale sono presenti dei cross-peaks tra il protone aldeidico a δ_H 9.30 e il C-3 (δ_C 27.7) e il C-4 (δ_C 139.3): le correlazioni chiave sono

mostrate nella figura 16. Inoltre il C-5 risuona a δ_C 163.7, risultando shiftato a campi più bassi rispetto a quanto riscontrato nella jaspamide in cui tale carbonio risuona a δ_C 127.8.

Tale valore di chemical shift è caratteristico di un carbonio β di un carbonile α,β -insaturo.

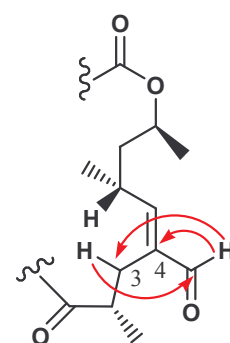


Figura 16. Correlazioni ¹H – ¹³C HMBC

L'identificazione dei residui aminoacidici di β -tirosina, N-metilbromotriptofano e alanina, è stata effettuata mediante paragone dei dati ^1H e ^{13}C NMR della jaspamide G con quelli riportati in letteratura.

L'assegnazione dei carboni carbonilici, e la determinazione della sequenza aminoacidica, è stata effettuata attraverso l'analisi dello spettro di correlazione ^1H - ^{13}C HMBC, e le correlazioni chiave sono mostrate nella figura 17.

In particolare, la presenza di un N-metilbromotriptofano è stata confermata dal picco di correlazione, nello spettro HMBC, tra il protone α del triptofano a δ_{H} 5.70 ed il carbonio metilico a δ_{C} 31.5.

Per quanto riguarda la β -tirosina, nello spettro HMBC sono presenti due cross-peaks tra il carbonile a δ_{C} 170.2 ed il protone in β a δ_{H} 5.16 e tra lo stesso carbonile ed il protone in α a δ_{H} 2.63.

Sempre nello spettro HMBC, è presente un picco di correlazione tra il carbonile a δ_{C} 175.2, relativo al residuo di β -tirosina, ed il protone dell'NH a δ_{H} 7.26 relativo al residuo di N-metilbromotriptofano. Ciò ha indicato che i due aminoacidi sono legati in sequenza tra di loro.

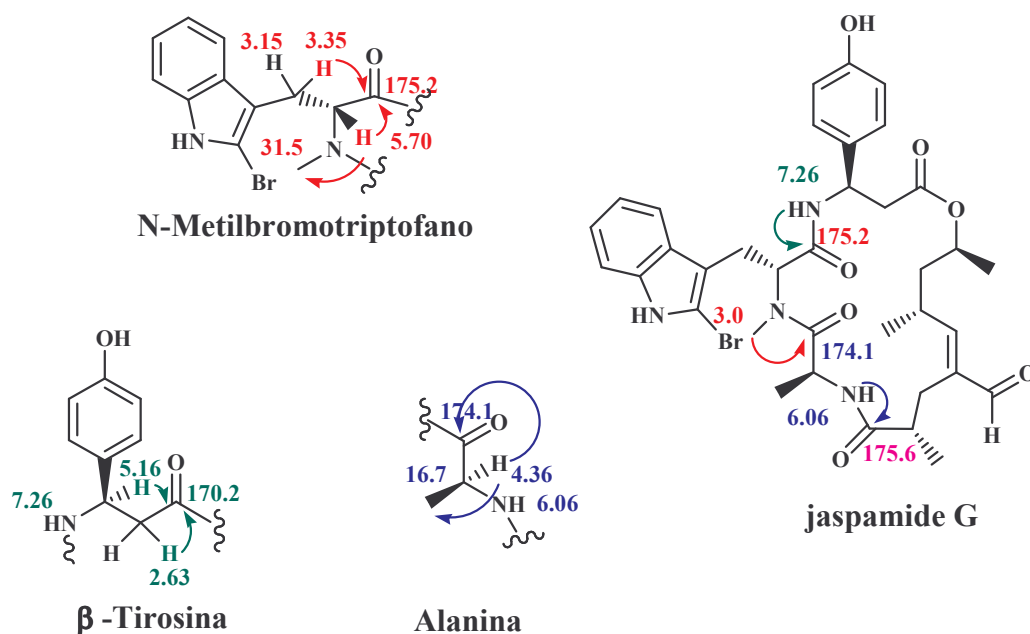


Figura 17. Correlazioni ^1H – ^{13}C HMBC

L'analisi dello spettro HMBC ha permesso di confermare anche la presenza dell'alanina, come si evince dalle correlazioni tra il protone a δ_H 4.36 ed il carbonio carbonilico a δ_C 174.1 e tra lo stesso protone ed il metile in catena laterale a δ_C 16.7.

Il residuo di alanina risulta essere legato sia all'N-metilbromotriptofano che alla catena di polipropionato. Infatti, nello spettro HMBC, è presente sia un picco di correlazione tra il metile sull'N dell'N-metilbromotriptofano a δ_H 3.0 ed il carbonile dell'alanina a δ_C 174.1, sia un picco di correlazione tra il protone sull'N a δ_H 6.06 dell'alanina ed il carbonile a δ_C 175.6 in posizione C-1 della catena.

Dopo aver determinato la struttura della jaspamide G, è stata definita la stereochimica della catena di polipropionato e della porzione amminoacidica.

Un'attenta analisi dello spettro ROESY (Figura 18) ha permesso di **definire come E la configurazione del doppio legame in posizione 4**. Infatti sono risultati ben evidenti nello spettro ROESY picchi di correlazione tra il protone aldeidico (δ_H 9.30) e il protone metinico in 5 (δ_H 6.37) e tra il protone metilenico in 3 (δ_H 2.45) e il protone metinico in 6 (δ_H 2.95).

Lo spostamento del C-3 a chemical shifts più alti (δ_C 27.7) rispetto alla jaspamide ha confermato la presenza nel nuovo ciclodepsipeptide di un doppio legame con configurazione *E* in posizione 4.

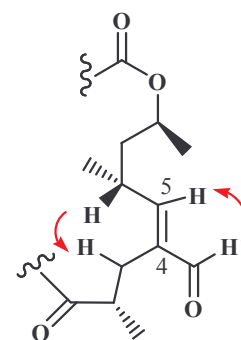
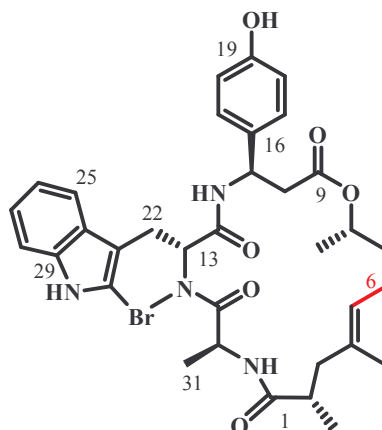


Figura 18. Correlazioni ROE

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi, così come per le jaspamidi precedentemente descritte, si è deciso di utilizzare il metodo Marfey. Anche in questo caso si è dedotto che, come nella jaspamide A, **la serie sterica dei residui di N-metilbromotriptofano e β -tirosina è D**, mentre **la serie sterica del residuo di alanina è L**.

Jaspamide H

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide H, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 695.2450 ($M+H$)⁺ attribuito alla formula molecolare C₃₅H₄₃BrN₄O₆.

Confrontati i dati con quelli della jaspamide si è osservato la presenza di 14 u.m.a. in meno.

L'analisi dello spettro ¹H-NMR ha indicato chiaramente che i valori di chemical shift relativi alla porzione tripeptidica della jaspamide H sono sovrapponibili a quelli della jaspamide di riferimento, suggerendo così che la modifica risiede nell'unità di polipropionato.

Lo spettro evidenzia l'assenza del segnale a δ_H 0.87, e la presenza di due nuovi segnali a δ_H 1.48 e a δ_H 1.78, che sono risultati essere i protoni di un metilene che dallo spettro HSQC risultano accoppiati con un carbonio a δ_C 23.3. L'analisi dello spettro COSY ha risaltato la presenza di due sistemi di spin: il primo da H-2 a H-3 ed il secondo da H-5 a H-8. Inoltre erano evidenti i cross-peaks del protone H-5 a δ_H 4.96 con i protoni metilenici a δ_H 1.48 e a δ_H 1.78.

La presenza dei segnali tipici degli altri gruppi metilici presenti nella jaspamide A ha fatto supporre che questa nuova molecola si differenziasse dalla capostipite per l'assenza di un CH₃ in posizione 6. Lo spettro di correlazione ¹H-¹³C long range HMBC ha permesso di confermare la catena polichetidica come acido 8-idrossi-2,4-dimetilnon-4-enoico (Figura 19).

Diagnostici, a tal proposito sono stati i segnali di correlazione tra il Me-2 a δ_H 1.06 con C-1 (δ_C 174.4) C-2 (δ_C

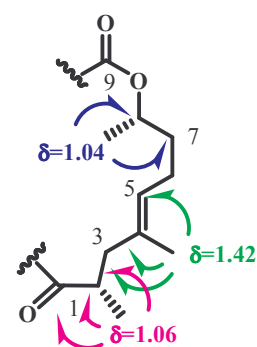


Figura 19: Correlazioni ¹H-¹³C HMBC

40.1) e C-3 (δ_C 43.6), tra il Me-4 a δ_H 1.42 con C-3, C-4 (δ_C 134.6) e C-5 (δ_C 124.5) e tra il Me-8 a δ_H 1.04 con C-7 (δ_C 35.9) e C-9 (δ_C 40.3).

L'identificazione dei residui aminoacidici di β -tirosina, N-metilbromotriptofano e alanina, è stata effettuata mediante paragone dei dati 1H e ^{13}C NMR della jaspamide H con quelli riportati in letteratura.

L'assegnazione dei carboni carbonilici, e la determinazione della sequenza aminoacidica, è stata effettuata attraverso l'analisi dello spettro di correlazione 1H - ^{13}C HMBC, e le correlazioni chiave sono mostrate nella figura 20. La presenza della β -tirosina è stata confermata da cross-peaks tra il carbonile a δ_C 170.5 ed i protoni a δ_H 2.70 e δ_H 5.17.

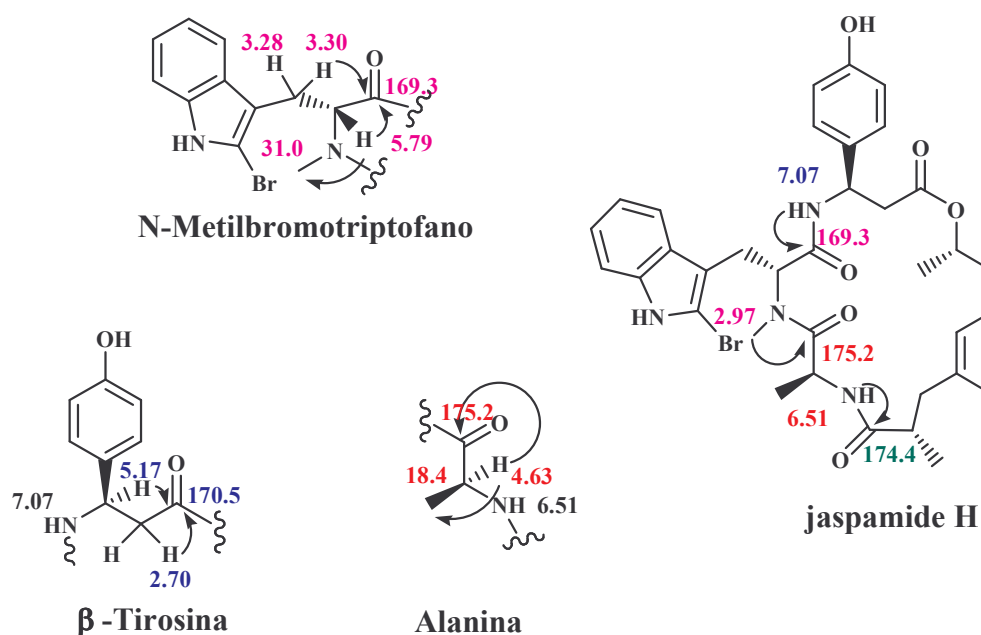


Figura 20. Correlazioni $^1H - ^{13}C$ HMBC

Picchi di correlazioni tra il protone in α del triptofano a δ_H 5.79 con il carbonio N-metilico a δ_C 31.0 ed il carbonio carbonilico a δ_C 169.3 hanno confermato la presenza dell' N-metilbromotriptofano.

Infine il residuo di alanina è stato evidenziato dalla presenza di cross-peaks tra il protone H-15 a δ_H 4.63 con il metile 31 in catena laterale a δ_C 18.4 ed il carbonio carbonilico a δ_C 175.2.

Sempre nello spettro HMBC è presente un segnale di correlazione tra il C δ_C 169.3 del residuo di N-metilbromotriptofano con il protone dell' N-H del residuo di β -tirosina a δ_H 7.07.

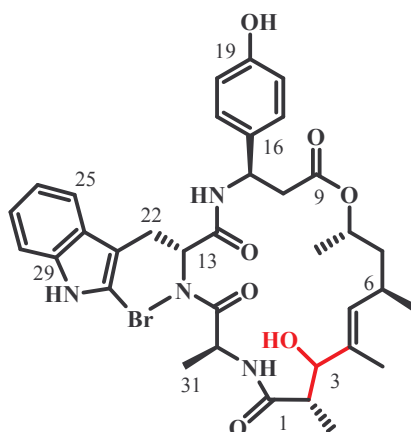
Inoltre il segnale tra i protoni del metile su N dell' N-metilbromotriptofano a δ_C 2.97 con il carbonile dell'alanina a δ_C 175.2 e quello tra il carbonile in posizione 1 della catena

polichetidica δ_C 174.4 con il protone sull' N dell'alanina δ_C 6.51.hanno permesso di chiudere il ciclo del depsipeptide.

Passo successivo alla caratterizzazione strutturale della jaspamide F, è stata la definizione della stereochimica della catena di polipropionato e della porzione amminoacidica.

Per quanto riguarda la porzione di polipropionato, dobbiamo sottolineare che esiste una sovrapposizione sostanzialmente teorica dei valori di tutte le risonanze protoniche e ^{13}C della jaspamide H con quelli riportati per la jaspamide di riferimento, suggerendo che gli stereocentri presenti in questa porzione hanno le stesse configurazioni relative in entrambe le molecole.

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi, così come per le jaspamidi precedentemente descritte, si è deciso di utilizzare il metodo di Marfey. Anche in questo caso si è dedotto che, come nella jaspamide capotipite **la serie sterica dei residuo di N-metilbromotriptofano e β -tirosina è D**, mentre **la serie sterica del residuo di alanina è L**.

Jaspamide I

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide I, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 725.6745 ($M+H$)⁺ attribuito alla formula molecolare C₃₆H₄₅BrN₄O₇.

Paragonando la formula molecolare a quella della jaspamide capostipite si deduceva la presenza di un atomo di ossigeno in più.

Lo studio dei dati ¹H e ¹³C NMR ha evidenziato in questo nuovo analogo tutti i segnali caratteristici della porzione tripeptidica della jaspamide mentre notevoli differenze si osservavano per la porzione di polipropionato, dove evidentemente bisognava allocare l'ossigeno addizionale.

Lo spettro ¹H NMR mostra un segnale doppietto a δ_H 3.98 (d, J = 10.3 Hz) tipico di un di un protone legato a un carbonio ossigenato di tipo metinico. Lo spettro COSY ha mostrato, poi, la correlazione tra questo segnale con quello di un metino allilico a δ_H 2.47 a sua volta accoppiato con un protone metilico a δ_H 1.28.

Determinante ai fini della caratterizzazione strutturale è stato l'esperimento HMBC (Figura 21) che ha evidenziato la correlazione del carbonio carbinolico a δ_C 77.9 (cioè quello legato direttamente, come evidenziato dall'HSQC, al protone a δ_H 3.98) con il protone vinilico C-5, i protoni del metile in C-4 a δ_H 1.71 ed i protoni del metile in C-2 a δ_H 1.28. Questi ultimi, a loro volta evidenziavano un cross-peak J^3 con il carbonio carbonilico in posizione 1 a δ_C 173.0 impegnato nel legame peptidico con il residuo amminoacidico di alanina.

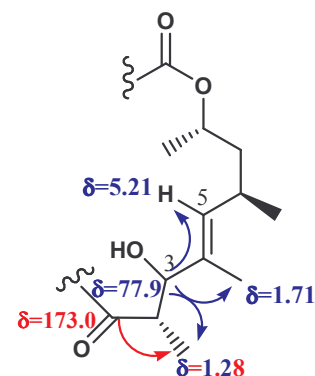
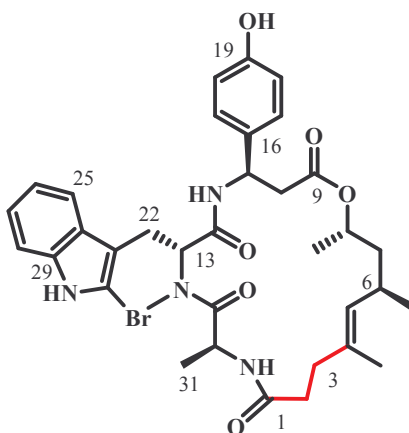


Figura 21. Correlazioni HMBC

È stato così possibile definire la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3 della catena di polipropionato. Restava da determinare la stereochimica assoluta di questo addizionale centro stereogenico e a questo proposito si è pensato di utilizzare il metodo di Mosher.

Purtroppo la jaspamide I risultava instabile nelle condizioni di reazione previste dal metodo andando incontro a degradazione e non consentendo quindi di poter determinare la configurazione assoluta del carbonio carbinolico in posizione 3.

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi, così come per le jaspamidi precedentemente descritte, si è deciso di utilizzare ancora una volta il metodo di Marfey. Anche in questo caso si è dedotto che, come nella jaspamide **la serie sterica dei residuo di N-metilbromotriptofano e β -tirosina è D**, mentre **la serie sterica del residuo di alanina è L**.

Jaspamide J

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide J, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 695.2450 $(M+H)^+$ attribuito alla formula molecolare $C_{35}H_{43}BrN_4O_6$.

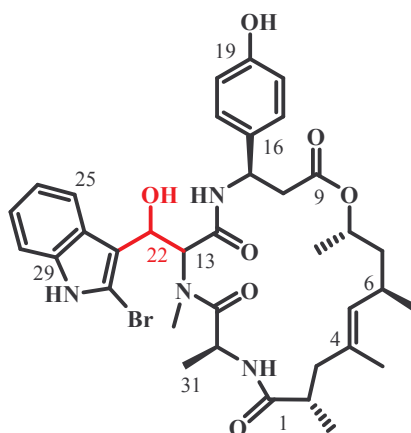
Confrontati i dati con quelli della jaspamide capostipite si è osservato, a pari di quanto accaduto per le jaspamidi F ed H la presenza di 14 u.m.a. in meno facendo ipotizzare una possibile assenza di un gruppo metilico.

L'analisi dello spettro 1H -NMR ha indicato chiaramente che i valori di chemical shift relativi alla porzione tripeptidica della jaspamide H sono sovrapponibili a quelli della jaspamide capostipite, suggerendo così che la modifica risiedeva nell'unità di polipropionato.

L'analisi dello spettro COSY ha evidenziato un sistema di spin tra i gruppi metilenici a δ_H 2.05- δ_H 2.30 (δ_C 21.8) e δ_H 2.38- δ_H 2.48 (δ_C 32.0) finora mai riscontrato in altri analoghi.

Fondamentali ai fini della caratterizzazione strutturale, è stata ancora una volta l'analisi dello spettro HMBC in cui si evidenziavano correlazioni tra i protoni metilenici a δ_H 2.05- δ_H 2.30 con il carbonio carbonilico C-1 a δ_C 171.0 e tra il carbonio a δ_C 32.0 con i protoni del metile vinilico in posizione 4 a δ_H 1.60. Tali dati hanno permesso di definire la presenza di una subunità CH_2-CH_2 in posizione 2-3 all'interno di una catena di polipropionato caratterizzata come acido 8-idrossi 4,6-dimetilnon-4-enoico.

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi, così come per le jaspamidi precedentemente descritte, si è deciso di utilizzare il metodo di Marfey. Anche in questo caso si è dedotto che, come nella jaspamide capostipite **la serie sterica dei residuo di N-metilbromotriptofano e β -tirosina è D**, mentre **la serie sterica del residuo di alanina è L**.

Jaspamide K

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide K, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 725.6880 ($M+H$)⁺ attribuito alla formula molecolare C₃₆H₄₅BrN₄O₇ che faceva supporre la presenza di un atomo di ossigeno in più rispetto alla jaspamide capostipite.

A differenza però di quanto osservato per la jaspamide I l'analisi dello spettro ¹H-NMR ha indicato chiaramente che le risonanze relative all'unità di polipropionato della jaspamide K erano sovrapponibili a quelle della jaspamide di riferimento, suggerendo così che la modifica doveva risiedere nella porzione tripeptidica.

Inoltre, la presenza dei segnali caratteristici dei residui amminoacidici di tirosina ed alanina ha fatto supporre una piccola modifica della struttura del residuo di N-metilabrina.

Dall'analisi dello spettro protonico si notava l'assenza dei due segnali doppietto a δ_H 3.30 circa relativo ai due protoni diastereotopici in posizione 22, e la presenza di un nuovo segnale doppietto a δ_H 5.59. Quest'ultimo nello spettro HSQC risultava legato ad un carbonio a δ_C 66.8, segnale distintivo un carbonio ossigenato di tipo metinico legato ad un anello aromatico.

Lo shift a campi più bassi di H-13 (δ_H 6.00, d 9.6 Hz) e di C-23 (δ_C 113.2) e C-13 (δ_C 59.5), ovvero dei carboni adiacenti al C-22, erano in linea con l'ipotesi effettuata.

Lo spettro HMBC, ha poi definitivamente confermato la presenza di un gruppo ossidrilico sul C β del residuo di N-metilbromotriptofano. Diagnostiche sono state le correlazioni osservate tra H-22 (δ_H 5.59) con C-23 (δ_C 113.2), C-13 (δ_C 59.5), C-12 (δ_C 170.3), C-24 (δ_C 126.3) (Fig. 22).

Analogamente il C-22 a δ_C 66.8 presentava J² con H-13 a δ_H 6.00.

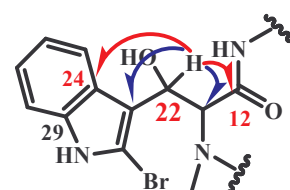
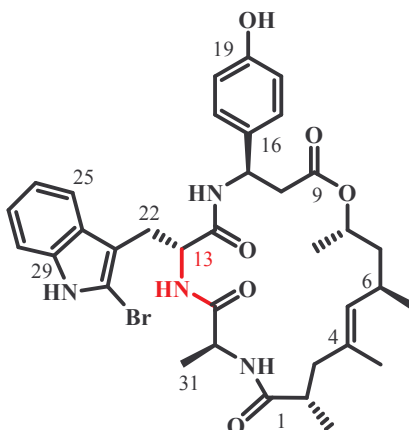


Figura 22. Correlazioni ¹H – ¹³C HMBC

L'HMBC ha poi permesso anche l'assegnazione dei carboni carbonilici e la determinazione dell'intera sequenza del cisiclopeptide.

Definita la struttura della jaspamide K, passo successivo è stata la determinazione della stereochimica assoluta dei singoli residui amminoacidici. Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi di alanina e tirosina, così come per le jaspamidi precedentemente descritte, si è deciso di utilizzare ancora una volta il metodo di Marfey. Anche in questo caso si è dedotto che, come nella jaspamide capostipite che **la serie sterica dei residuo di β -tirosina è D**, mentre la **serie sterica del residuo di alanina è L**.

Per quanto riguarda il nuovo residuo di N-metil idrossitriptofano l'assenza di un adeguato standard di riferimento non ha permesso la definizione della stereochimica assoluta.

Jaspamide L

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide L, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 695.2390 $(M+H)^+$ attribuito alla formula molecolare $C_{35}H_{43}BrN_4O_6$. Si evidenziava quindi un valore di 14 u.m.a. in meno rispetto alla jaspamide compatibile con la mancanza di un CH_2 .

A dispetto della situazione già descritta per le jaspamidi F, H e J, dove le 14 u.m.a. in meno risultavano dalla sostituzione, nell'unità di polipropionato, di un $CH-Me$ con un CH_2 , rispettivamente nelle posizioni 4, 6 e 2, i dati NMR per la jaspamide L evidenziavano che la perturbazione riguardava la porzione tripeptidica.

L'analisi dello spettro 1H -NMR ha indicato, infatti, chiaramente che le risonanze relative all'unità di polipropionato della jaspamide L erano sovrapponibili a quelle della jaspamide di riferimento. In questo caso, infatti, risultava evidente l'assenza del segnale singoletto a δ_H 3.00, che in tutte le altre jaspamidi finora isolate era stato sempre attribuito al metile sull'atomo di azoto del residuo amminoacidico di N-metilbromotriptofano.

Lo spettro 1H NMR presentava, inoltre, un segnale a δ_H 6.11 (d, $J = 7.7\text{Hz}$) che nello spettro di correlazione diretta 1H - ^{13}C HSQC non correlava con alcun segnale, e pertanto veniva assegnato come protone scambiabile legato ad azoto. Le correlazioni HMBC a carico di questo segnale rispettivamente con il $C\alpha$ (δ_C 54.1) assegnato all'unità di bromo triptofano, e il $C=O$ (δ_C 172.9) assegnato al residuo di Ala, consentivano di stabilire la presenza nella jaspamide L di un unità di Bromo-Trp e non di NMe-Br-Trp.

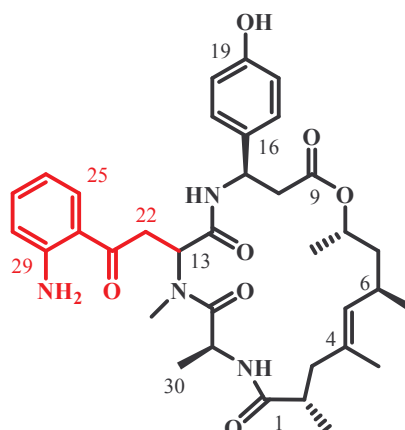
L'assegnazione di tutte le risonanze rimanenti come pure la determinazione della sequenza, è stata realizzata attraverso l'analisi combinata dei dati COSY, HSQC e di correlazione 1H - ^{13}C "long range"/ HMBC.

Passo successivo è stata la determinazione della stereochimica assoluta dei singoli residui amminoacidici ed anche in questo caso si è deciso di ricorrere al metodo di Marfey.

Per la definizione della serie sterica del residuo di bromotriptofano si è deciso, così come fatto per il suo analogo N-metilato delle altre jaspamidi, di sfruttare la capacità di degradarsi in presenza di ozono ad acido aspartico e derivatizzare il prodotto come previsto dalla metodica di Marfey.

Considerando che anche la tirosina, al pari del bromotriptofano, in ambiente di ozono si degrada ad acido aspartico, la presenza di un unico picco con m/z 386 ha permesso di definire come **D** la stereochimica assoluta di entrambi gli amminoacidi.

Così come in tutte le altre jaspamidi, inoltre, l'alanina presentava serie sterica **L**.

Jaspamide M

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide M, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione pseudomolecolare a m/z 634.2250 $(M+H)^+$ attribuito alla formula molecolare $C_{35}H_{46}N_4O_7$.

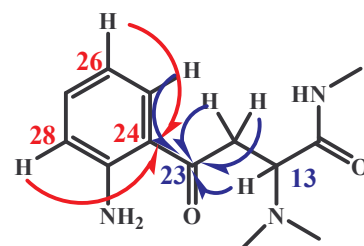
L'assenza del picco di massa $M+2$, peculiare di tutti i composti bromurati, ha permesso di stabilire l'assenza dell'atomo di bromo, finora presente in tutte le jaspamidi isolate.

L'analisi dello spettro 1H -NMR ha indicato chiaramente che le risonanze relative all'unità di polipropionato della jaspamide M erano sovrapponibili a quelle della jaspamide di riferimento, suggerendo così che la modifica doveva risiedere nella porzione tripeptidica.

Inoltre la presenza dei segnali caratteristici dei residui amminoacidici di tirosina ed alanina ha fatto immediatamente supporre un completo stravolgimento della struttura del triptofano.

L'analisi dello spettro COSY ha evidenziato un sistema di spin di quattro protoni aromatici-assegnati a un anello fenilico orto disostituito.

Lo studio degli spettri HMBC ed HSQC, consentiva di assegnare i carboni relativi ai 4 protoni aromatici e di evidenziare la presenza di due C aromatici quaternari a δ_C 149.7 ed a δ_C 118.0. Il legame del carbonio a δ_C 149.7 con un gruppo NH_2 veniva stabilito su considerazioni di massa e di chemical shift mentre il quaternario a δ_C 118.0 veniva legato a un carbonio carbonilico a δ_C 198.0 in base ai picchi di correlazione HMBC con i protoni aromatici H-26 a δ_H 6.75 e H-28 a δ_H 6.63 (Figura 23 frecce rosse).



Correlazioni HMBC tra il carbonile a δ_C 198.0 con i due protoni diastereotopici a δ_H 3.28 e δ_H 3.74 (H22a e H-22b) e con il protone α -amminoacidico a δ_H 5.84 (H-13) consentiva di

Figura 23. Correlazioni $^1H - ^{13}C$ HMBC

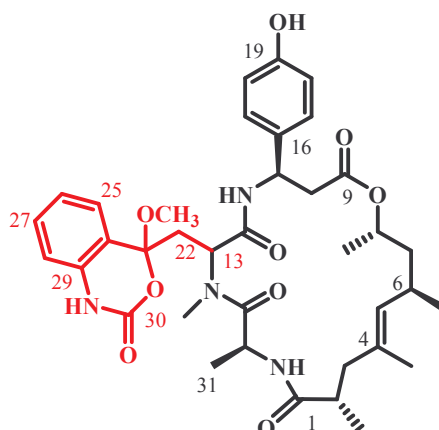
legare al C=O la porzione CH₂-CH α . (Figura 23 frecce blu).

Le correlazioni del protone H-13 a δ_H 5.84 con il carbonio metilico (δ_C 31.2) legato all'azoto e viceversa dei protoni metilici a δ_H 3.00 con il carbonio aminoacidico C-13 a δ_C 53.5 consentiva definitivamente di stabilire la presenza di un residuo di N-metilchinurenina..

Da una rapida revisione della letteratura si è notato che tale residuo compare in un solo altro metabolita secondario la brunsvicamide C un esapeptide ciclico isolato dal cianobatterio *Tychonema* sp. I dati NMR di tale composto risultavano decisamente comparabili con quelli del residuo di N-metilchinurenina presente nella jaspamide M ad ulteriore supporto dell'ipotesi fatta.

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi di alanina e tirosina, così come per le jaspamidi precedentemente descritte, si è deciso di utilizzare ancora una volta il metodo di Marfey. Anche in questo caso si è dedotto che, come nella jaspamide capostipite **la serie sterica del residuo di β -tirosina è D**, mentre **la serie sterica del residuo di alanina è L**.

Per quanto riguarda il residuo di N-metilchinurenina, non essendo disponibile commercialmente uno standard adeguato non è stato possibile, invece, procedere alla determinazione della stereochimica assoluta.

Jaspamide N

Lo spettro di massa ad alta risoluzione della jaspamide N, ottenuto mediante ionizzazione ESI a ioni positivi, ha mostrato uno ione a m/z 715.31567 ($M+Na$)⁺ attribuito alla formula molecolare C₃₅H₄₆N₄O₇.

L'assenza del picco di massa M+2, peculiare di tutti i composti bromurati, ha permesso di stabilire l'assenza dell'atomo di bromo, come già osservato nella jaspamide M.

L'analisi dello spettro ¹H-NMR ha indicato chiaramente che le risonanze relative all'unità di polipropionato della jaspamide N erano sovrapponibili a quelle della jaspamide di riferimento, suggerendo così che la modifica doveva risiedere nella porzione tripeptidica.

Inoltre la presenza dei segnali caratteristici dei residui amminoacidici di tirosina ed alanina ha fatto immediatamente supporre anche per la jaspamide N un completo stravolgimento della struttura del triptofano.

Un attento studio dello spettro protonico ha evidenziato un nuovo segnale singoletto a δ_H 3.19 che nello spettro HSQC correlava con un carbonio a δ_C 51.9 facendo supporre la presenza di un gruppo metossilico finora mai incontrato nelle jaspamidi isolate.

Lo spettro HMBC ha poi evidenziato una correlazione J³ tra il protone a δ_H 3.19 con un carbonio quaternario δ_C 108.0 a sua volta correlato ai 2 protoni diastereotopici in C-22 a δ_H 3.28 e δ_H 3.74 e con il protone α -amminoacidico H-13 δ_H 5.84 il che faceva presupporre la presenza di un carbonio quaternario, presumibilmente di tipo acetalico (da considerazioni di chemical shift), in posizione 23 (Figura 24).

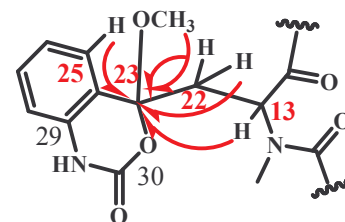
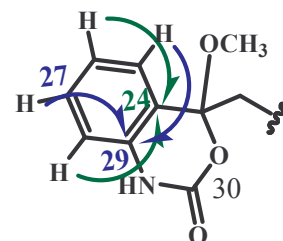


Figura 24. Correlazioni ¹H – ¹³C HMBC

L'analisi dello spettro COSY ha, inoltre, evidenziato un sistema di spin di quattro protoni aromatici che i dati HMBC hanno poi assegnato ad un anello fenilico orto di-sostituito.

Come mostrato dalla figura 25 i due carboni quaternari dell'anello aromatico venivano rispettivamente legati al carbonio acetalico C-23 e a un azoto in base alle HMBC mostrate, a considerazioni di chemical shift e ai dati di massa. Le ultime 2 insaturazioni previste dalla formula molecolare venivano soddisfatte dalla chiusura di un anello di tipo ossazinonico tra l'azoto e il carbonio in posizione 23.



Calcoli di chemical shift protonici e ^{13}C hanno definitivamente supportato la struttura proposta.

Figura 25. Correlazioni $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi di alanina e tirosina, così come per le jaspamidi precedentemente descritte, si è deciso di utilizzare ancora una volta il metodo di Marfey. Anche in questo caso si è dedotto che, come nella jaspamide capostipite **la serie sterica del residuo di β -tirosina è D**, mentre **la serie sterica del residuo di alanina è L**.

Per quanto riguarda il nucleo benzossazinonico, non essendo disponibile commercialmente uno standard adeguato non è stato possibile, invece, procedere alla determinazione della stereochimica assoluta.

Tabella 1. ^1H e ^{13}C NMR (700 MHz, CDCl_3) di jaspamide D ed E

Jaspamide D			Jaspamide E		
Posizione	δ_{H}	δ_{C}	Posizione	δ_{H}	δ_{C}
1	-	174.8	1	-	177.6
2	2.50 m	39.5	2	2.58 m	40.2
3a	1.83 d (16.2) ^a	40.8	3a	1.94 d (16.0)	41.1
3b	2.38 dd (16.2, 11.4)		3b	2.33 dd (16.0, 11.6)	
4	-	133.9	4	-	134.0
5	4.75 d (9.5)	127.9	5	4.77 d (9.8)	128.6
6	2.26 m	29.4	6	2.27 m	29.4
7a	1.11 m	43.9	7a	1.19 m	43.8
7b	1.25 m		7b	1.32 m	
8	4.59 m	71.6	8	4.64 m	70.8
9	-	170.1	9	-	171.1
10a	2.62 dd (5.2, 14.9)	40.5	10a	2.60 dd (4.9, 12.2)	40.4
10b	2.65 dd (4.8, 14.9)		10b	2.70 dd (6.8, 15.0)	
11	5.30 m	49.5	11	5.31 m	49.2
12	-	170.0	12	-	169.8
13	5.86 dd (6.8, 11.3)	56.0	13	5.77	55.7
14	-	173.3	14	-	171.3
15	4.79 m	51.5	15	4.76 m	54.4
16	-	132.0	16	-	132.1
17	7.07 d (8.2)	127.9	17	7.01 d (8.3)	127.8
18	6.75 d (8.2)	115.9	18	6.71 d (8.3)	116.0
19	-	155.1	19	-	155.4
20	6.75 d (8.2)	115.9	20	6.71 d (8.3)	116.0
21	7.07 d (8.2)	127.9	21	7.01 d (8.3)	127.8
22a	3.12 dd (11.3, 15.3)	23.9	22a	3.30 ovl	23.4
22b	3.33 dd (6.8, 15.3)		22b	3.30 ovl	
23	-	110.7	23	-	109.4
24	-	127.3	24	-	127.5
25	7.25 ovl	110.9	25	7.24 ovl	111.5
26	7.12 t (7.3)	120.8	26	7.09 t (7.7)	120.6
27	7.15 t (7.6)	123.0	27	7.15 t (7.3)	129.0
28	7.56 d (7.9)	118.7	28	7.51 d (8.1)	118.4
29	-	136.2	29	-	136.3
30	-	108.4	30	-	110.4
31a	1.59 m	24.4	31a	3.21 m	65.5
31b	1.06 m		31b	3.13 m	
32	0.11 t (6.9)	7.07	-	-	-
Me-2	1.12 d (7.1)	21.6	Me-2	1.15 d (6.9)	20.8
Me-4	1.60 s	19.1	Me-4	1.58 s	18.8
Me-6	0.83 d (7.0)	22.6	Me-6	0.84 d (6.8)	22.6
Me-8	1.06 d (6.9)	19.7	Me-8	1.08 d (6.1)	19.3
Me-N	3.0 s	31.5	Me-N	2.98 s	31.3
NH-Tyr	7.61 d (8.7)	-	NH-Tyr	7.56 d (8.0)	-
NH-Trp	8.02 s	-	NH-Trp	8.02 s	-
NH-Aba	6.53 d (6.6)	-	NH-Ser	6.87 d (6.4)	-

^aLe costanti di accoppiamento in parentesi sono espresse in Hertz. L'assegnazione dei dati ^1H e ^{13}C è stata effettuata mediante esperimenti ^1H , COSY, HSQC e HMBC. Ovl: (overlapped) sovrapposti.

Tabella 2. ^1H e ^{13}C NMR (700 MHz, CDCl_3) di jaspamide F e G

Jaspamide F			Jaspamide G		
Posizione	δ_{H}	δ_{C}	Posizione	δ_{H}	δ_{C}
1	-	174.5	1	-	175.6
2	2.29 m	42.0	2	2.57 m	39.8
3a	1.92 m	35.8	3a	2.45 d (11.2)	27.7
3b	2.36 m		3b	2.60 m	
4	5.42 dt (6.2, 15.6) ^a	126.9	4	-	139.3
5	5.22 dd (7.6, 15.6)	135.1	5	6.37 d (10.0)	163.7
6	1.90 m	33.6	6	2.95 m	31.0
7a	1.12 m	41.8	7a	1.40 m	43.5
7b	1.44 m		7b	1.54 m	
8	4.74 m	70.5	8	4.88 m	69.4
9	-	170.2	9	-	170.2
10a	2.60 dd (7.0, 15.0)	40.7	10a	2.63 dd (3.5, 16.7)	40.7
10b	2.68 dd (4.5, 15.0)		10b	2.82 dd (10.9, 16.7)	
11	5.22 m	48.9	11	5.16 m	49.8
12	-	168.9	12	-	175.2
13	5.76 dd (6.6, 9.8)	55.6	13	5.70 dd (5.5, 10.7)	55.8
14	-	174.0	14	-	174.1
15	4.74 m	45.7	15	4.36 m	45.9
16	-	132.2	16	-	134.5
17	7.00 d (8.3)	127.5	17	7.05 d (7.3)	127.7
18	6.70 d (8.3)	115.5	18	6.70 d (8.3)	115.7
19	-	154.6	19	-	156.3
20	6.70 d (8.3)	115.5	20	6.70 d (8.3)	115.7
21	7.00 d (8.3)	127.5	21	7.05 d (7.3)	127.7
22a	3.21 dd (9.8, 15.3)	23.6	22a	3.15 dd (10.3, 15.0)	23.4
22b	3.35 dd (6.6, 15.3)		22b	3.35 dd (5.5, 15.0)	
23	-	110.4	23	-	111.9
24	-	127.1	24	-	136.5
25	7.25 ovl	110.7	25	7.20 d (7.3)	110.7
26	7.09 t (7.4)	120.6	26	7.05 t (7.3)	120.3
27	7.15 t (7.2)	122.7	27	7.10 t (7.6)	122.4
28	7.54 d (8.4)	118.4	28	7.49 d (8.0)	118.5
29	-	135.8	29	-	137.9
30	-	108.8	30	-	111.9
31	0.78 d (6.7)	18.1	31	0.74 d (6.75)	16.7
Me-2	1.10 d (6.8)	19.7	Me-2	1.14 d (6.3)	19.1
-	-	-	HCO-4	9.30	196.2
Me-6	0.87 m	22.3	Me-6	0.97 d (6.6)	20.2
Me-8	1.04 d (6.3)	19.3	Me-8	1.03 d (6.4)	21.3
Me-N	3.0 s	31.0	Me-N	3.0 s	31.5
NH-Tyr	7.68 m		NH-Tyr	7.26 d (7.8)	
NH-Trp	8.05 s		NH-Trp	8.16 s	
NH-Ala	6.58 d (6.4)		NH-Ala	6.06 d (6.2)	

^aLe costanti di accoppiamento in parentesi sono espresse in Hertz. L'assegnazione dei dati ^1H e ^{13}C è stata effettuata mediante esperimenti ^1H , COSY, TOCSY, HSQC e HMBC. Ovl: (overlapped) sovrapposti.

Tabella 3. ^1H e ^{13}C NMR (700 MHz, CDCl_3) di jaspamide H e I

Jaspamide H			Jaspamide I		
Posizione	δ_{H}	δ_{C}	Posizione	δ_{H}	δ_{C}
1	-	174.4	1	-	173.0
2	2.46 m	40.1	2	2.43 m	47.6
3a	1.88 m	43.6	3	3.98 d (10.3)	77.9
3b	2.33 m		4	-	137.6
4	-	134.6	5	5.21 d (9.3)	131.0
5	4.96 t (6.6) ^a	124.5	6	2.25 m	29.2
6a	1.48 m	23.3	7a	1.24 m	43.4
6b	1.78 m		7b	1.49 m	
7a	1.26 m	35.9	8	4.69 m	70.3
7b	1.26 m		9	-	170.2
8	4.65 m	70.3	10a	2.62 dd (7.7, 15.4)	40.8
9	-	170.5	10b	2.72 dd (4.3, 15.4)	
10a	2.57 dd (7.9, 15.7)	40.0	11	5.26 m	49.2
10b	2.70 dd (3.8, 15.7)		12	-	168.6
11	5.17 m	49.2	13	5.65 t (8.1)	55.5
12	-	169.3	14	-	173.8
13	5.79 dd (6.6, 10.0)	55.3	15	4.58 m	46.2
14	-	175.2	16	-	132.1
15	4.63 m	46.4	17	6.94 d (7.3)	127.7
16	-	133.0	18	6.69 d (7.3)	115.7
17	7.06 d (8.3)	127.7	19	-	155.3
18	6.74 d (8.3)	115.7	20	6.69 d (7.3)	115.7
19	-	155.2	21	6.94 d (7.3)	127.7
20	6.74 d (8.3)	115.7	22a	3.19 dd (9.6, 15.2)	23.8
21	7.06 d (8.3)	127.7	22b	3.29 dd (7.0, 15.2)	
22a	3.28 ovl	23.4	23	-	109.9
22b	3.30 ovl		24	-	127.1
23	-	110.7	25	7.22 d	110.5
24	-	127.8	26	7.09 t (7.4)	122.8
25	7.25 ovl	110.6	27	7.15 t (7.4)	120.7
26	7.10 t (7.4)	120.5	28	7.52 d (7.9)	118.5
27	7.14 t (7.4)	122.9	29	-	135.9
28	7.54 d (8.0)	118.4	30	-	109.3
29	-	136.5	31	0.78 d (6.2)	18.1
30	-	109.1	Me-2	1.28 d (7.0)	16.9
31	0.68 d (6.7)	18.4	Me-4	1.71 s	16.6
Me-2	1.06 d (6.2)	20.1	-	-	-
Me-4	1.42 s	16.4	Me-6	0.88 d (6.7)	21.6
-	-	-	Me-8	1.11 d (6.8)	20.0
Me-8	1.04 d (6.2)	19.6	Me-N	3.0 s	31.1
Me-N	2.97	31.0	NH-Tyr	7.03 d (7.6)	-
NH-Tyr	7.07 d (8.3)	-	NH-Trp	8.03 s	-
NH-Trp	8.10 s	-	NH-Ala	6.57 d (6.5)	-
NH-Ala	6.51 d (6.4)	-			

^aLe costanti di accoppiamento in parentesi sono espresse in Hertz. L'assegnazione dei dati ^1H e ^{13}C è stata effettuata mediante esperimenti ^1H , COSY, HSQC e HMBC. Ovl: (overlapped) sovrapposti.

Tabella 4. ^1H e ^{13}C NMR (700 MHz, CDCl_3) di jaspamide J e K

Jaspamide J			Jaspamide K		
Posizione	δ_{H}	δ_{C}	Posizione	δ_{H}	δ_{C}
1	-	170.7	1	-	174.9
2a	2.05	21.8	2	2.49 m	43.8
2b	2.30		3a	2.38 m	40.9
3a	2.38		3b	2.38 m	
3b	2.48		4	-	134.0
4	-	133.5	5	4.71 m	127.2
5	4.71 m	126.6	6	2.26 m	29.7
6	2.23 m	29.0	7a	1.26 m	43.9
7a	1.22 ovl	43.3	7b	1.26 m	
7b	1.22 ovl		8	4.62 m	71.5
8	4.60 m	70.6	9	-	171.3
9	-	39.5	10a	2.68	40.1
10a	2.63 dd (5.0, 15.0) ^a		10b	2.62	
10b	2.63 dd (5.1, 15.0)		11	5.34 m	49.1
11	5.30 m		12	-	170.3
12	-	170.7	13	6.00 d (9.6)	59.5
13	5.87 dd (5.8, 10.8)	55.1	14	-	174.4
14	-	174.1	15	4.65 m	45.9
15	4.74 m	45.6	16	-	132.6
16	-	132.2	17	7.07 d (8.5)	127.0
17	7.10 d (8.5)	127.4	18	6.84 d (8.5)	115.0
18	6.77 d (8.5)	115.2	19	-	155.4
19	-	154.6	20	6.84 d (8.5)	115.0
20	6.77 d (8.5)	115.2	21	7.07 d (8.5)	127.0
21	7.10 d (8.5)	127.4	22	5.59 d (9.6)	66.8
22a	3.24 dd (10.8, 15.4)	22.7	23	-	113.2
22b	3.38 dd (5.8, 15.4)		24	-	126.3
23	-		25	7.24 ovl	110.7
24	-		26	7.15 t (7.2)	123.2
25	7.26 ovl	110.3	27	7.12 t (7.3)	121.3
26	7.13 t (7.4)	120.3	28	7.80 d (7.8)	119.6
27	7.16 t (7.4)	122.7	29	-	136.7
28	7.56 d (8.0)	118.1	30	-	109.5
29	-	136.0	31	0.41 d (7.0)	17.4
30	-	109.3	Me-2	1.11 d (6.5)	20.7
31	0.73 d (6.8)	17.6	Me-4	1.58 s	18.7
-	-	-	Me-6	0.83 d (6.6)	22.3
Me-4	1.60 s	18.7	Me-8	1.09 d (6.5)	19.1
Me-6	0.82 d (6.6)	22.2	Me-N	2.88 s	30.3
Me-8	1.07 d (6.4)	30.6	NH-Tyr	8.00 d (8.3)	-
Me-N	2.97 s		NH-Trp	8.20 s	-
NH-Tyr	7.65 d (8.5)		NH-Ala	6.50 d (6.8)	-
NH-Trp	8.00 s				
NH-Ala	6.0 d (6.7)	-			

^aLe costanti di accoppiamento in parentesi sono espresse in Hertz. L'assegnazione dei dati ^1H e ^{13}C è stata effettuata mediante esperimenti ^1H , COSY, HSQC e HMBC. Ovl: (overlapped) sovrapposti.

Tabella 5. ^1H e ^{13}C NMR (700 MHz, CDCl_3) di jaspamide L, M ed N

Jaspamide L			Jaspamide M			Jaspamide N		
Posiz.	δ_{H}	δ_{C}	Posiz.	δ_{H}	δ_{C}	Posiz.	δ_{H}	δ_{C}
1	-	175.5	1	-	175.1	1	-	175.5
2	2.52 m	40.0	2	2.58	40.6	2	2.57	39.6
3a	1.90 d (16.2) ^a	41.1	3a	2.10	41.0	3a	1.89	40.8
3b	2.35 dd (16.2, 10.8)		3b	2.25		3b	2.43	
4	-	134.6	4	-	134.0	4	-	133.7
5	4.74 d (7.5)	128.7	5	4.75	128.9	5	4.73	127.3
6	2.26 m	29.7	6	2.27	29.8	6	2.23	29.7
7a	1.13 m	43.7	7a	1.23	44.1	7a	1.08	44.0
7b	1.13 m		7b	1.35		7b	1.21	
8	4.65 m	71.4	8	4.67	71.4	8	4.60	71.5
9	-	171.5	9	-	170.4	9	-	171.4
10a	2.44 dd (4.4, 14.6)	40.7	10a	2.74	40.9	10a	2.59	40.4
10b	2.56 dd (6.4, 14.6)		10b	2.62		10b	2.65	
11	5.14 m	50.2	11	5.29	49.5	11	5.14	49.5
12	-	170.1	12	-	170.3	12	-	168.4
13	5.13 dd (6.4, 4.4)	54.1	13	5.84	53.5	13	5.47	53.5
14	-	172.9	14	-	172.9	14	-	173.8
15	4.47 m	49.0	15	4.60	47.0	15	4.69	48.9
16	-	132.6	16	--	132.0	16	-	132.2
17	6.95 d (8.4)	127.6	17	7.10	128.0	17	7.01	127.6
18	6.70 d (8.4)	115.7	18	6.77	115.9	18	6.69	115.7
19	-	154.9	19	-	155.0	19	-	155.8
20	6.70 d (8.0)	115.7	20	7.10	115.9	20	6.69	115.7
21	6.95 d (8.0)	127.6	21	6.77	128.0	21	7.01	127.6
22a	3.30 d (7.0)	26.4	22a	3.28	37.0	22a	2.46	37.6
22b	3.30 d (7.0)		22b	3.74		22b	2.97	
23	-	110.6	23	-	198.0	23	-	108.0
24	-	127.3	24	-	117.8	24	-	117.8
25	7.29 d (8.1)	110.9	25	7.76	131.2	25	7.26	125.8
26	7.12 t (7.7)	121.3	26	6.65	116.3	26	7.10	124.3
27	7.19 t (7.7)	127.6	27	7.27	135.0	27	7.29	134.2
28	7.56 d (7.8)	118.8	28	6.63	117.6	28	6.74	114.6
29	-	136.8	29	-	150.8	29	-	135.1
30	-	108.0	30	1.34	18.6	30	-	154.8
31	1.17 d (6.8)	19.1	-	-	-	31	1.38	18.5
Me-2	1.13 d (6.9)	20.3	Me-2	1.21	21.0	Me-2	1.17	21.0
Me-4	1.60 s	18.8	Me-4	1.58	19.1	Me-4	1.60	18.9
Me-6	0.82 d (6.6)	22.3	Me-6	0.87	22.6	Me-6	0.80	22.5
Me-8	1.01 d (6.3)	19.3	Me-8	1.09	19.7	Me-8	1.06	19.5
H-Trp	6.11 d (7.7)	-	Me-N	3.00	31.2	Me-N	3.00	31.5
-	-	-	-	-	-	-OCH ₃	3.19	51.9
NH-Ty	7.60 d (7.8)	-	NH-Ty	7.56	-	NH-Ty	7.69	-
NH-Tr	8.24 s	-	NH ₂ -K	4.00	-	NH-Bz	8.00	-
NH-Al	6.40 d (6.6)	-	NH-Al	6.80	-	NH-Al	6.79	-

^aLe costanti di accoppiamento in parentesi sono espresse in Hertz. L'assegnazione dei dati ^1H e ^{13}C è stata effettuata mediante esperimenti ^1H , COSY, HSQC e HMBC. Ovl: (overlapped) sovrapposti.

Attività farmacologica

Tutte le jaspamidi isolate sono state saggiate *in vitro* per determinare l'attività sulla proliferazione di cellule tumorali umane di tipo MCF-7 (carcinoma della mammella) e HT-29 (carcinoma del colon). Il capostipite, la jaspamide, ha mostrato una IC_{50} di 0.019 μ M su cellule MCF-7 e di 0.035 μ M su cellule HT-29. Le jaspamidi D ed E hanno mostrato valori di citotossicità paragonabili a quelli della jaspamide, mentre le jaspamidi B, C, F e G hanno mostrato una minore attività su entrambe le linee cellulari (Tabella 6).

Composto	Linea cellulare	
	MCF- 7 IC_{50} (μ M)	HT-29 IC_{50} (μ M)
Jaspamide	0.019 \pm 0.001	0.035 \pm 0.004
Jaspamide B	3.4 \pm 1.9	3.3 \pm 0.9
Jaspamide C	2.0 \pm 0	2.6 \pm 0.3
Jaspamide D	0.05 \pm 0	0.08 \pm 0
Jaspamide E	0.02 \pm 0	0.02 \pm 0
Jaspamide F	30 \pm 0.0	Non testato
Jaspamide G	0.60 \pm 0.07	1.66 \pm 0.07
Jaspamide H	15 \pm 0.0	Non testato
Jaspamide I	0.48 \pm 0.09	0.90 \pm 0.07
Jaspamide J	Non testato	Non testato
Jaspamide K	33 \pm 2.5	Non testato
Jaspamide L	0.10 \pm 0	0.18 \pm 0
Jaspamide M	0.38 \pm 0.09	0.3 \pm 0
Jaspamide N	12.0 \pm 2.1	6.5 \pm 1.1

Tabella 6. Dati di attività citotossica su MCF-7 ed HT-29.

Da una attenta analisi dei dati mostrati in tabella 6 è possibile risalire a quale sia la porzione farmacoforica responsabile di tale tipo di attività

In particolare l'alanina, assente nelle jaspamidi D ed E, non pare essere un residuo farmacoforico, perché la sua sostituzione con residui differenti determina comunque ottimi valori di citotossicità nell'ordine di 10^{-8} M.

Al contrario modifiche sull'unità di polipropionato, caratteristiche delle jaspamidi B, C, F e G possono provocare un cambio significativo nella conformazione di questi derivati portando una diminuzione dell'affinità con il target biologico.

In particolare, l'assenza del metile nelle posizioni 4 (jaspamide F) e 6 (jaspamide H) è responsabile di un abbassamento dei valori di IC_{50} di ben quattro ordini di grandezza rispetto alla jaspamide capostipite. La sostituzione, invece, dello stesso gruppo metilico in 4 con un formile (jaspamide G) determina, una riduzione d'attività citotossica, di solo 1,5 volte. Analogo effetto si ha in presenza di un gruppo esometilene sempre in posizione 4 (jaspamide B e C). Questi dati suggeriscono un coinvolgimento di primaria importanza della catena polichetidica, nell'interazione col sito recettoriale.

Analizzando i dati delle jaspamidi modificate nel residuo di N-metil bromotriptofano è evidente come la semplice assenza metile su N (jaspamide L) non modifica l'attività citotossica, così come la sostituzione col residuo di chinurenina (jaspamide M) continua a presentare buoni valori di IC_{50} . Un importante peggioramento si ottiene, invece, con la sostituzione dell'N-metilabrina (jaspamide N) con un anello benzossazinonico.

Tutti i metaboliti isolati presentano comunque un'attività citotossica di un certo rilievo e, sicuramente ciò è da attribuire, almeno in parte alla presenza in tutti del residuo di β -tirosina.

Dati di citotossicità di analoghi sintetici della jaspamide prive del residuo di β -tirosina hanno, infatti, mostrato capacità pressoché nulla di determinare apoptosi nelle cellule bersaglio.³⁸

Al fine di determinare il meccanismo biologico in grado di giustificare l'attività antiproliferativa, tutte le jaspamidi isolate sono state testate sui microtubuli e sui microfilamenti.

La citocalasina B è stata usata, alla concentrazione 2 μ M, come controllo positivo per l'attività antimicrofilamento, mentre la colchicina (5 μ M) per l'attività anti-microtubuli. Tutte le jaspamidi sono state testate alla concentrazione citotossica (IC_{50}) e ad una concentrazione dieci volte superiore sia sui microfilamenti che sui microtubuli.

Per tutti i derivati è stato osservato un estensivo cambio nella morfologia dei microfilamenti mentre la struttura dei microtubuli è risultata essenzialmente inalterata (Fig.26).

Come si può osservare dalle immagini allegate, ci sono molti "loci" di aggregazione e una perdita di organizzazione del citoscheletro cellulare. La concentrazione dieci volte maggiore delle loro rispettive IC_{50} ha provocato, per tutte le jaspamidi testate, morte cellulare

che si manifesta come pronunciata contrazione, formazione di aggregati fluorescenti di actina e presenza frequente di cellule multinucleate.

Questi dati sono in accordo con il principio che la citotossicità di questi derivati è causata dalla distruzione della struttura e della funzionalità del citoscheletro in maniera del tutto analoga a quanto precedentemente osservato per la jaspamide.

Questi dati sono in accordo con il principio che la citotossicità di questi derivati è causata dalla distruzione della struttura e della funzionalità del citoscheletro in maniera del tutto analoga a quanto precedentemente osservato per la jaspamide.

Tutti i saggi sono stati effettuati dal gruppo di ricerca del prof. Charles D.Smith del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche della South Caroline Medical University.

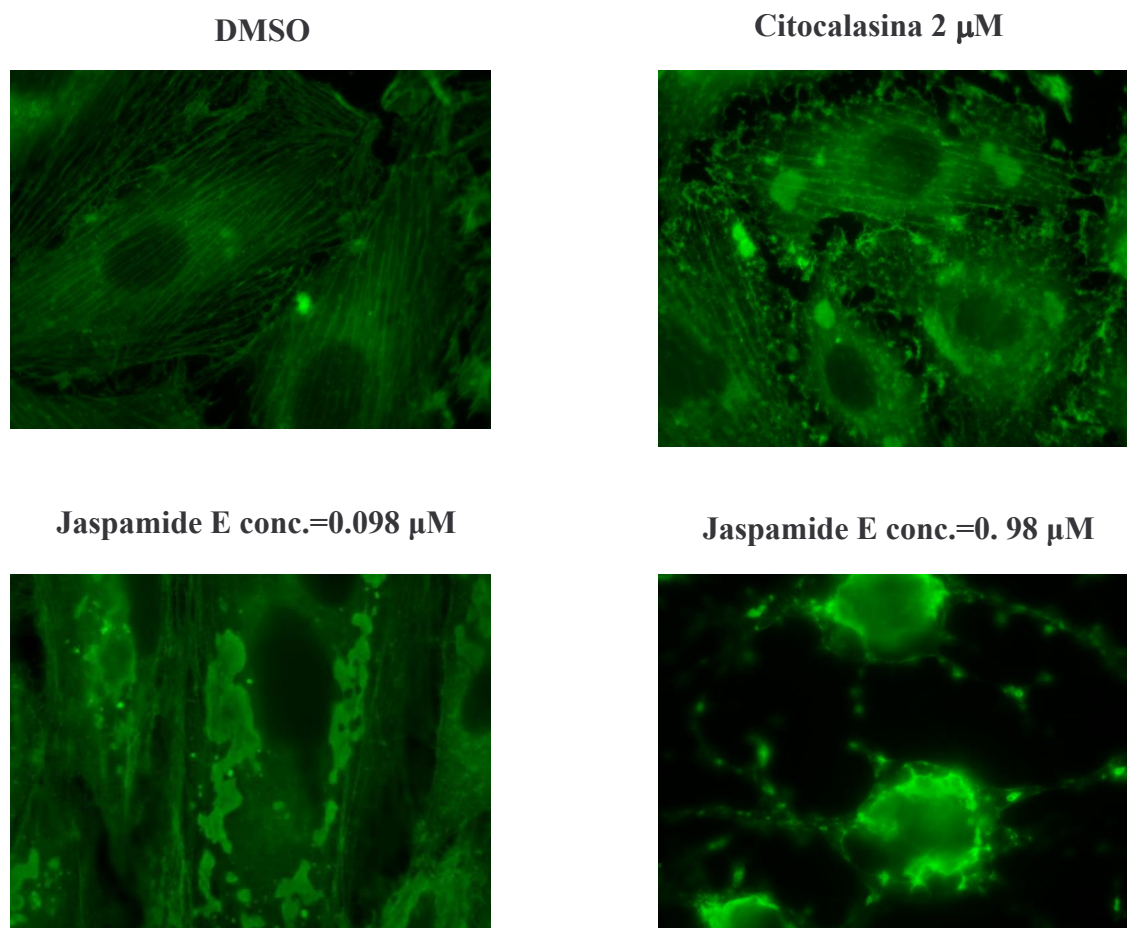


Figura 26. Attività sui microfilamenti della jaspamide E

CAPSICUM ANNUUM L.

Il *capsicum* (Figura 27), comunemente noto come peperoncino, è usato come alimento fin da tempi antichissimi.

La passione dell'uomo per i frutti di questo vegetale, risale addirittura a 6.000 anni fa. Una serie di reperti fossili, rinvenuti nell'Ecuador sud-occidentale, ne testimoniano, infatti, la diffusione su vastissima scala addirittura prima della scoperta della ceramica.

Se nell'America centrale, quindi, la pianta era conosciuta e coltivata da millenni, in Europa arrivò solo nel 1514 stivato nelle caravelle di Colombo che tornavano nel vecchio continente. Il nome con il quale era chiamato in tutto il nuovo mondo era "chili" e così è rimasto.

Il primo occidentale che conobbe sulla lingua il sapore piccante del peperone fu il medico della seconda spedizione di Colombo, Diego Alvaro Chanca, che lo usò come condimento nel 1494.

Fino al secolo sedicesimo, nessuno dei grandi popoli della civiltà occidentale aveva mai potuto aromatizzare le sue vivande con l'apporto di questo vegetale allegro, umile, vivificante. Il peperoncino acutissimo al gusto apparve subito adatto per conservare e insaporire le vivande: tant'è che il Mattioli, medico senese autore di un famoso trattato sulle piante del 1568, ne parla già come di una pianta comune, chiamandolo "*pepe cornuto*" o *pepe d'India*.

Comincia da qui la difficile e intricata questione della nomenclatura, che troverà solo con la sistematica di Linneo³⁹ ("*Species Plantarum*") nel 1753, il definitivo nome scientifico di "*Capsicum*". Il termine sembra derivare dal latino *capsa* che significa "cassetta", "custodia" e descrive perfettamente il frutto: una piccola scatola con all'interno la placenta su cui sono posizionati i semi. Il termine può anche derivare dal verbo greco *kapto* che significa "mangiare avidamente", riferito al fatto che la bacca, usata come condimento, stimola l'appetito.

In brevissimo tempo la coltivazione del pepe d'India si diffuse nei paesi del mediterraneo, favorita dal clima e dal sole. Attecchì benissimo nell'Italia meridionale, dove il peperoncino è rimasto, quasi ovunque, l'aroma preferito, e in tutta l'Africa settentrionale.



Figura 27. *Capsicum annuum*

Oggigiorno il genere *Capsicum* ha una vasta diffusione geografica che va dalla cintura intertropicale alle latitudini del Nord Europa ed i frutti (peperoni e peperoncini) possono vantare una produzione mondiale di 23 milioni di tonnellate annue e una superficie coltivata di 1,7 milioni di ettari, che li classificano al secondo posto dopo il pomodoro.

Classificazione botanica

In base alla più recente classificazione, il genere *Capsicum* appartiene: Regno *Plantae* Divisione *Magnoliophyt* Classe *Magnoliopsid* Ordine *Solanales* Famiglia *Solanaceae*.

Il genere *Capsicum* comprende all'incirca 25 specie selvatiche e 5 coltivate (Tabella 7).

Specie di <i>Capsicum</i>			
Selvatiche		Coltivate	
<i>C. annum</i>	<i>C. mirabile</i>	<i>C. pubescens</i>	
<i>var. aviculare</i>	<i>C. parvifolium</i>	<i>C. baccatum</i>	
<i>C. buforum</i>	<i>C. praetermissum</i>	<i>C. chinense</i>	
<i>C. campylopodium</i>	<i>C. schottianum</i>	<i>C. frutescens</i>	
<i>C. cardenasii</i>	<i>C. scolnikianum</i>	<i>C. annum</i>	
<i>C. chacoense</i>	<i>C. tovarii</i>		
<i>C. ciliatum</i>	<i>C. villosum</i>		
<i>C. coccineum</i>	<i>C. cornutum</i>		
<i>C. dimorphum</i>	<i>C. leptopodium</i>		
<i>C. eximium</i>	<i>C. dusenii</i>		
<i>C. geminifolium</i>	<i>C. galapagoense</i>		
<i>C. lanceolatum</i>	<i>C. hookerianum</i>		
<i>C. minutiflorum</i>			

Tabella 7. Diverse specie del genere *Capsicum*

Tutte le specie selvatiche condividono caratteri simili: frutti piccoli di colore rosso, eretti, con un pedicello tenero che, raggiunta la maturità, ne permette il facile distacco dal calice.

Questa caratteristica facilita l'azione degli uccelli frugivori che, attratti dal colore dei frutti e non sensibili ai capsaicinoidi, ne garantiscono la disseminazione.

Tra le specie (Fig. 28) coltivate la varietà diffusa in Italia è solo il *Capsicum annum* mentre le altre varietà si coltivano soprattutto in America Meridionale e in Messico⁴⁰



Figura 28. Diverse specie di *Capsicum*

Capsicum Annuum L.

Il *Capsicum annuum* L. è una pianta erbacea annuale. L'apparato radicale è tendenzialmente superficiale e raggiunge approssimativamente i 30 cm di profondità. Anche se esso è abbastanza robusto non è in grado di fornire un sufficiente sostegno alla pianta durante lo sviluppo vegetativo. Infatti nella fase di ingrossamento dei frutti può piegarsi in modo marcato.

Il fusto può raggiungere un'altezza variabile tra i 40 cm e 1 m.

Le foglie, alterne, lucide, a lamina ovata o ellittica, acuminate e a margine intero; sono ricche di stomi sulla pagina inferiore, più povere su quella superiore.

I fiori (Fig. 29), caratterizzati da corolla bianca, rotata, con sei petali, sono ermafroditi, localizzati all'ascella delle ramificazioni e caratterizzati da un peduncolo breve che si incurva permettendo la caduta del polline sullo stelo. Il sistema riproduttivo è tendenzialmente autogamo. La fioritura ha inizio con uno o due fiori sul primo nodo, successivamente i fiori si sviluppano sugli altri nodi seguendo una progressione geometrica. Solitamente si sviluppano più di cento fiori su ogni pianta.



Figura 29. Fiore *Capsicum annuum* L.

Il frutto (Fig. 30) è una bacca carnosa ed indeiscente. Nella regione peduncolare è presente un tessuto placentare bianco e spugnoso sul quale sono inseriti i semi. La bacca può avere portamento pendulo o eretto in base alla disposizione dei fiori. L'epidermide a maturazione può assumere colorazioni diverse: giallo, rosso, arancione o bruno. L'uniformità di colorazione è indice dell'avvenuta maturazione in condizioni ambientali e colturali buone.

I semi (Fig. 30) sono di colore giallo, hanno una forma tonda, fortemente appiattita, con un diametro di 3-5 mm. Il numero varia da 120 a 160 per grammo, in funzione alla varietà e alla posizione delle bacche sulla pianta. La produzione del seme è fortemente influenzata dalle condizioni meteorologiche (luce e temperatura).



Figura 30. Frutto e semi di *Capsicum annuum* L.

Le diverse varietà di *C. annuum* L. sono solitamente classificate in base alle caratteristiche dei frutti colore, forma, sapore, dimensioni e utilizzo (Fig.31).

Il capostipite più probabile del *C. annuum* L. coltivato è il selvatico “chiltepin” (*C. annuum* L. varietà *avirculare*), caratterizzato da un’ampia diffusione, dall’America meridionale all’Arizona. Prima della colonizzazione spagnola, gli Aztechi ne avevano già sviluppato una dozzina di varietà. La specie, che è la più coltivata nel mondo, include: i “chile peppers” messicani, i peperoncini piccanti coltivati in Africa e Asia e le diverse varietà di peperone dolce coltivato nelle regioni temperate dell’Europa e del Nord America.



Fig. 31. Alcune varietà di *Capsicum annuum* L.:

1. var. *acuminatum*, detto *Cajenna*
2. var. *cerasiferum*, detto *a ciliegia grande*
3. var. *cerasiferum*, detto *cerasiello*
4. var. *abbreviatum*, detto *Ogiva*
5. var. *abbreviatum*, detto *naso di cane*
6. var. *acuminatum*, detto *Amando*
7. var. *fasciculatum*, detto *a sigaretta*
8. var. *fasciculatum* detto *Chipas*
9. var. *acuminatum*, detto *a ciondolo*
10. var. *avirculare*, detto *chiltepin*
11. var. *longum*, peperoncino dolce detto ***Corno di Toro Rosso***
12. var. *grossum*, peperone dolce
13. var. *grossum*, detto *topepo*

Le più apprezzate sono la varietà *longum*, con frutto dolce di forma allungata (“Corno di toro rosso”, “Proboscide d’elefante”, “Verticus” ecc.), la varietà *acuminatum*, con frutti sottili a cono allungato leggermente ricurve, piccanti o dolci (“Peperoncino lungo sottile di Cajenna”, “Sigaretta di Bergamo”, “Amando”, ecc.), la varietà *grossum*, con frutto dolce di forma quadrangolare (“Giallo o Rosso quadrato dolce di Nocera”, “California Wonder”, “Topepo” o “Peperone pomodoro” ecc.).

Molto diffuse sono anche la varietà *abbreviatum*, con frutti piccoli e conici che non superano i 5 cm (“Pimento”, “Nano quarantino d’Asti”, “Naso di cane”, “Oviga”, ecc.), la varietà *fasciculatum* con frutti dritti e sottili molto piccanti (“a sigaretta”, “Chipas”, ecc.) e la varietà *cerasiferum* con frutti piccoli e tondi come le ciliegie dalle quali prendono il nome (“la ciliegia grande”, “Cerasiello”, ecc.).

Composizione ed attività farmacologica

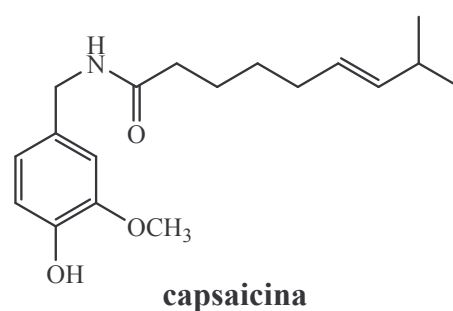
Lo studio sistematico effettuato negli ultimi 50 anni, ha permesso di individuare i principali costituenti chimici (Tabella. 8) e le relative percentuali presenti nelle piante appartenenti alla specie *Capsicum annuum* L.

Vitamine A ₁ (0.53%) C (0.13%) B ₁ , B ₂ E, K, PP	Flavonoidi quercetina luteolina	Carotenoidi violaxantina capsantina α -carotene capsorubina	Capsaicinoidi capsaicina (0.01-0.22%) diidrocapsaicina nordiidrocapsaicina omocapsaicine omodiidrocapsaicine	Sali minerali fosforo (0.02%) potassio (0.19%) sodio (0.01%) calcio ferro
Carboidrati (5.2%)	Proteine (1.35%)	Capsicolo, Olio fisso	Sostanze azotate non azotate	Cellulosa Lipidi (0.3%) Acqua

Tabella 8. Composizione tipo di una varietà di *Capsicum annuum* L.

Il metabolita secondario più interessante è sicuramente l' N-(4-idrossi-3-metossibenzil)-8-metilnonan-*trans*-6-enamide meglio conosciuta come **capsaicina**,⁴¹ un alcaloide che insieme alla diidrocapsicina, è il responsabile principale dell' azione urticante dei frutti sulla mucosa e sulla cute.

Gli altri capsaicinoidi (presenti per lo più nella placenta del frutto), si differenziano per modifiche nella catena laterale alchilica che sembra essere determinante per l'azione urticante.⁴²



L'azione irritante è dovuta all'attivazione da parte della capsaicina, mediante la porzione vanillinica, del recettore vanilloide di tipo 1 (TRPV1).⁴³ Si tratta di un recettore canale non selettivo che attivato, si apre permettendo un flusso di ioni calcio che determina una depolarizzazione delle fibre nervose della via della nocicezione con conseguente produzione di impulsi nervosi che arrivano al cervello, attraverso la radice del ganglio dorsale, provocando una sensazione dolorosa.⁴⁴

La capsaicina esercita un'azione bifasica sui nervi sensoriali, cioè una iniziale eccitazione è seguita da un durevole periodo refrattario. L'esposizione alla capsaicina porta, infatti, dapprima ad una sensazione di bruciore dovuta all'eccitazione neuronale a cui segue un periodo di analgesia, in cui il neurone mostra desensitizzazione funzionale e non riesce a rispondere a successivi stimoli nocicettivi. Questa azione, sommata ad un aumento nel rilascio di endorfine, porta alla paradossale proprietà analgesica della capsaicina, che ha spronato la ricerca di derivati vanilloidi che mantengono l'azione antidolorifica con minimo o nullo effetto eccitatorio. Di queste proprietà analgesiche, però, ne erano già a conoscenza i Maya e gli Incas che usavano un estratto oleoso di peperoncino per curare il mal di denti.

Oggi sono usate pomate (per es. Axsain e Zostrix) a base di capsaicina per alleviare le sensazioni dolorose dovute ai processi infiammatori causati dall' *Herpes zoster*.

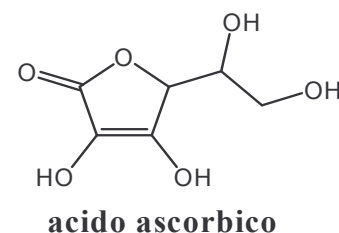
Alla capsaicina sono attribuite molte altre attività farmacologiche come quella antifungina⁴⁵ (*Zygosaccharomyces* e *Mycoplasma agalactiae*), fibrinolitica (prevenendo la formazione di trombi) e batteriostatica (*B. cereus* e *B. Subtilis*). In particolare, alcuni studi hanno mostrato una buona attività *in vitro* anti *Helicobacter pilori*.⁴⁶ Studi su linee cellulari di tumore alla prostata hanno anche evidenziato la capacità della capsaicina di indurre apoptosi⁴⁷ e di ridurre la produzione della proteina PAS, suggerendo così anche un interessante attività antiproliferativa.

Uno degli effetti più noti del peperoncino è sicuramente però la sua proprietà afrodisiaca e la capsaicina, insieme alla vitamina E, sembra essere coinvolta anche in quest'attività.

La capsaicina sembra, infatti, causare il rilascio dell'ormone VIP (vasoactive intestinal polypeptide) implicato nella chiusura delle comunicazioni arterovenose, fenomeno all'origine della tumescenza dei tessuti erettili. A ciò si aggiunge il rilascio, dopo una violenta stimolazione delle papille gustative di oppioidi endogeni che determinano una notevole sensazione di benessere.

Oltre che di capsaicinoidi, il peperoncino è particolarmente ricco anche di vitamine.

La **vitamina C**, o acido ascorbico, è stata isolata e caratterizzata per la prima volta nel 1937 dal medico ungherese Szent Gyorgyl proprio grazie ad una varietà ungherese di peperoncino. Il contenuto di vitamina C nelle bacche del capsicum risulta essere, in proporzione, anche



maggiore di quello presente in un arancia e questa elevata concentrazione, insieme quella di tutte le altre vitamine, conferisce al peperoncino un importantissima attività antiossidante.

La vitamina C inoltre favorisce l'assorbimento del ferro e previene infezioni dell'apparato respiratorio.

La **vitamina A₁** o **retinolo**, svolge un ruolo primario nel metabolismo cellulare ed è efficace nei problemi della vista. Inoltre è attiva sul trofismo delle mucose e degli epiteli in genere.

La vitamina E⁴⁸ denominata "long life", antiossidante naturale, riduce il consumo di ossigeno nei muscoli, aumenta l'ossigenazione nel sangue e protegge i tessuti dall'invecchiamento stimolando la produzione di prostaglandine, elementi ormonali capaci di svolgere azione benefica riparatoria dei tessuti delle arterie. Per cento grammi di prodotto è presente una quantità di vitamina E addirittura superiore alla razione giornaliera raccomandata, fissata a 8-10 mg/die.

Un'altra classe di composti chimici ad azione antiossidante è rappresentata dai **flavonoidi**.⁴⁹ Questi sono in grado di inibire alcuni enzimi quali la prostaglandina sintetasi, la lipossigenasi e la ciclossigenasi, la cui iperattività è coinvolta nella genesi dei tumori.⁵⁰

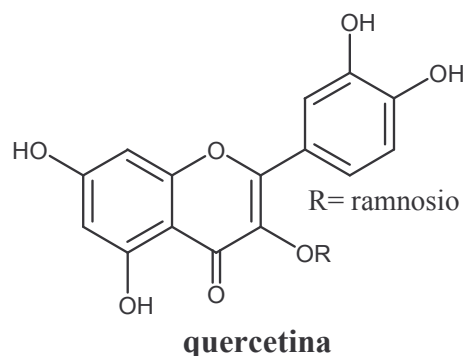
Nelle piante i flavonoidi sono presenti come glicosidi, con uno zucchero legato al carbonio in posizione 3 e vengono degradati ad agliconi in seguito all'ingestione per via orale.

La **quercetina** e la **luteolina** sono i principali flavonoidi presenti nel *Capsicum annuum* L.

I **carotenoidi**, invece, presenti nell'epicarpo, sono i responsabili principali del caratteristico colore rosso del peperoncino.

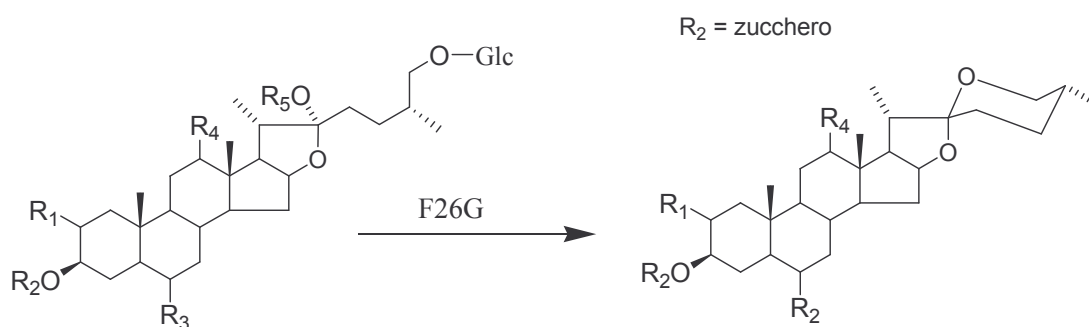
Le **saponine**, invece, sono glicosidi di natura triterpenoidica o steroidica rinvenute in radici, semi, germogli, rizomi e fiori di molte specie di piante ed in particolare anche nel *Capsicum annuum* L. La loro struttura chimica si compone di una parte apolare, detta aglicone, e di una porzione saccaridica che può essere legata all'aglicone in un solo punto (monodesmoside), oppure in due punti (bidesmoside), attraverso legami glicosidici. L'aglicone senza la porzione glicosidica prende il nome di sapogenina. Le saponine hanno spiccate proprietà tensioattive e schiumogene, per questo vengono impiegate nell'industria cosmetica per la produzione di shampoo, detergenti liquidi e dentifrici. Inoltre rientrano nelle formulazioni liquide per estintori.

Posseggono numerose proprietà biologiche, hanno azione emolitica poiché distruggono le membrane degli eritrociti; interagiscono con gli steroli di membrana ed altri componenti

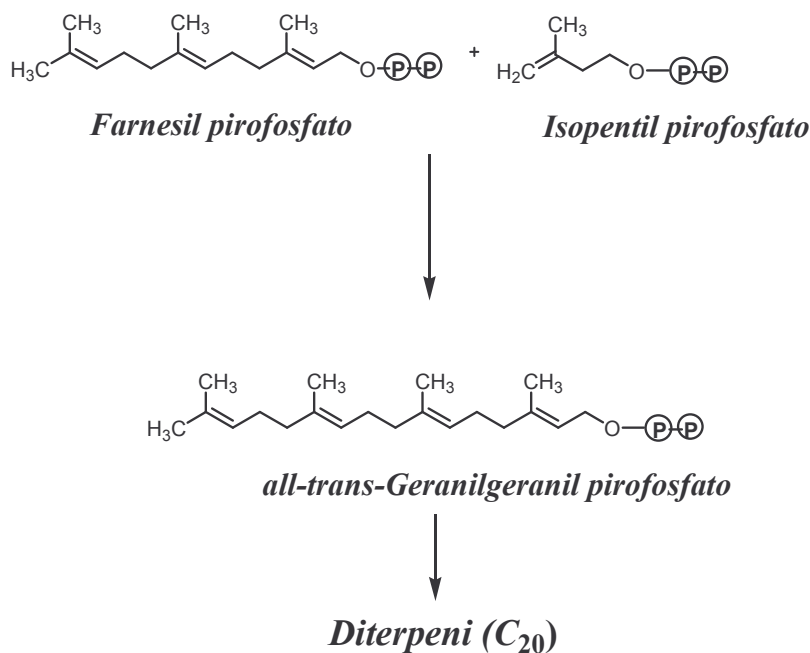


lipidici; inibiscono l'assorbimento gastrointestinale di colesterolo⁵¹ (azione anticolesterolemica) ed hanno rivelato, inoltre, azioni ipoglicemicizzante.⁵² Studi *in vivo* su ratti resi ipercolesterolemici hanno dimostrato che le saponine di natura steroidea a nucleo furostanico e spirostanico, isolate da fonti vegetali, provocano una diminuzione di colesterolo totale.

Inoltre si è notato che le strutture furostaniche, di tipo bidesmosidico (inattive), sono convertite *in vivo* in spirostaniche di tipo monodesmosidico (attive), grazie all'azione dell'enzima furostanolo glucoside-26-O- β -glucosidasi (F26G), che promuove l'idrolisi specifica del glucosio in posizione 26. Segue la reazione di acetalizzazione intramolecolare che porta alla formazione di un anello a sei termini.⁵³



Altra classe di molecole molto presenti nel peperoncino è quella dei **diterpeni** isolati dalle piante del *Capsicum annuum* L. principalmente sottoforma di glicosidi, denominati **capsianosidi**.⁵⁴ I terpenoidi costituiscono un'ampia famiglia di sostanze naturali strutturalmente diverse tra loro, derivanti da unità isopreniche (C₅H₈) unite in modo testa-coda. In particolare i diterpeni, che derivano dal geranilgeranil pirofosfato, hanno una catena alchilica costituita da 20 atomi di carbonio (4 unità isopreniche).

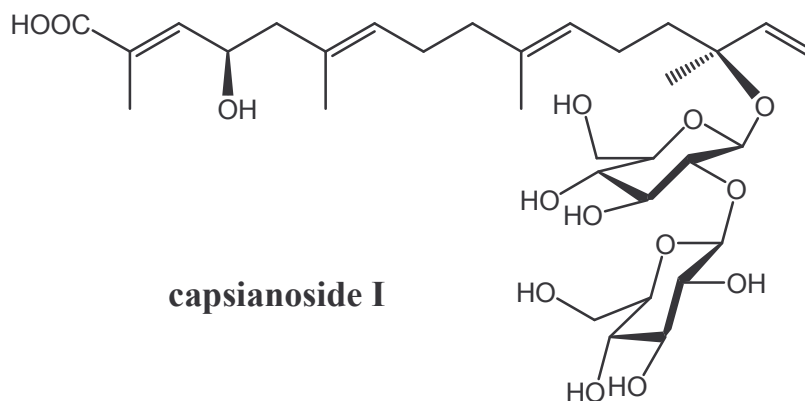


Schema 4. Biosintesi dei di terpeni

Nello schema 4 è riportata la biosintesi dei diterpeni. Come si può notare la reazione del farnesil pirofosfato con una molecola di isopentil pirofosfato dà all-trans-geranylgeranil pirofosfato, che è l'immediato precursore dei di terpeni.

Studi farmacologici, effettuati negli ultimi anni hanno evidenziato nei capsianosidi una potente azione antipertensiva.

Il **capsianoside I**, in particolare, costituito da un unità diterpenica legata in posizione 3 ad un unità disaccaridica ha mostrato in test, condotti presso l'Università di Tokyo nel 1990, una interessante attività di antagonista dell'enzima ACE (efficacia pari al 22.1% nelle quantità di 1.97 mg).⁵⁵ Tale effetto determina una diminuzione nella produzione di angiotensina II, peptide endogeno responsabile di vasocostrizione periferica.



Estrazione ed isolamento

Oggetto della mia attività di ricerca sono stati i frutti di una varietà dolce (var. *longum*) del *Capsicum annuum* L., nota nel Sud Italia come *Corno di Toro Rosso*. I pericarpi (260 g.), ricchi di metaboliti secondari, sono stati frullati ed estratti con metanolo per tre volte a temperatura ambiente per 12 ore.

Il residuo solido ottenuto (16.6 g.) è stato ripartito secondo la metodica di Kupchan che prevede l'utilizzo di quattro solventi a polarità crescente, ottenendo così quattro estratti: *n*-esano, CCl₄, CHCl₃ e *n*-BuOH.

L'estratto butanologico (11.4 g.) è stato frazionato mediante cromatografia contro corrente a goccia (DCCC), utilizzando in modo discendente un sistema ternario a due fasi costituito da *n*-BuOH/Me₂CO/H₂O (3:1:5) ad una velocità di flusso di 18 ml/h.

In base al comune comportamento cromatografico su TLC, le frazioni ottenute sono state raggruppate utilizzando come miscela eluente *n*-BuOH/HOAc/H₂O (12:3:5).

Le undici frazioni ottenute sono state ulteriormente purificate su colonna C18 μ -Bondapak analitica come descritto in tabella 9.

frazioni	quantità(mg)	composti	MeOH/H ₂ O
A (47-55)	67.2	inosina	1:9
B (56-63)	45.6	uridina	2:98
C (74-83)	36.4	Capsianoside III	6:4
D (84-899)	31.7	Capsianoside VIII	6:4
E (90-96)	37.8	Capsianosidi VIII e IX	6:4
F (106-112)	21.9	Capsianoside V e VIII	6:4
G (113-117)	12.0	Capsianoside V	6:4
H (132-142)	24.0	Capsianoside I metilestere	75:25
I (225-247)	23.9	Capsianoside I	1:1
L (266-274)	34.7	Capsianoside L	7:3
M (275-300)	76.0	quercetina	2:8
		3- <i>O</i> -ramnoside	

Tabella 9. Estratto *n*-BuOH: Frazioni separate con colonna C18 μ -Bondapak

Sono stati così ottenuti molti composti appartenenti alla famiglia dei Capsianosidi quali il Capsianoside I (4.7 mg), il Capsianoside III (2.5 mg), e il Capsianoside V (1.0 mg) ma soprattutto quattro nuovi analoghi denominati **Capsianoside VIII** (40.6 mg), **Capsianoside IX** (0.9 mg), **Capsianoside L** (3.5 mg) e **Capsianoside I metilestere** (4.8 mg).

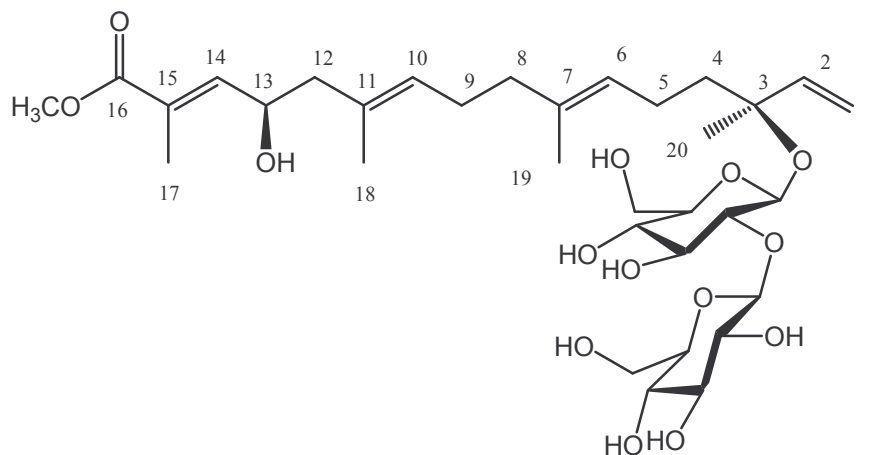
L'estratto CHCl_3 (1.2g) è stato poi purificato mediante cromatografia contro corrente a goccia (DCCC), utilizzando in modo ascendente un sistema ternario a due fasi costituito da $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:13:8) ad una velocità di flusso di 18 ml/h. In base al comune comportamento cromatografico su TLC, le frazioni ottenute sono state raggruppate utilizzando come miscele eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:2).

Le cinque frazioni ottenute sono state ulteriormente purificate su colonna C18 μ -Bondapak analitica usando, come eluente, una miscela di MeOH/ H_2O in differenti proporzioni portando all'isolamento di **ossilipina** (2.6mg), **fosfatidilcolina** (2.8 mg), **capsidiolo** (2.7 mg), **loliolide**⁵⁶ (0.7 mg), **3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)-gliceril- β -D-galactopiranoside** (6.9mg), **blumenol C glucoside**⁵⁷ (1.0 mg) come mostrato in tabella 10.

frazioni	quantità	composti	MeOH/ H_2O
24-32	40.3	Blumenol C glucoside	35:65 (+1%
66-76	32.5	Loliolide	6:4
77-84	22.0	Capsidiolo, ossilipina	6:4 (+1% HCOOH)
85-87	7.9	fosfatidilcolina	9:1 (+1% HCOOH)
161-175	22.5	3-O-(9,12,15-octadecatrienoil)-gliceril- β -D-galattopiranoside	9:1

Tabella 10. Estratto CHCl_3 : Frazioni separate con colonna C18 μ -Bondapak

La caratterizzazione strutturale di tutti i composti è stata effettuata mediante tecniche spettroscopiche quali la risonanza magnetica nucleare (NMR), sia monodimensionale (^1H , ^{13}C) che bidimensionale (TOCSY, COSY, HMBC e HSQC) e la spettrometria di massa ad alta risoluzione con sorgente FAB (HRMS-FAB).

Capsianoside I metilestere

L'analisi dello spettro di massa FAB ha evidenziato uno ione pseudomolecolare $[M-H]^-$ a m/z 673 e picchi di frammentazione a m/z 641 $[(M-H)-32]^-$ e m/z 479 $[641-162]^-$. mentre lo spettro IR ha indicato la presenza di un gruppo ossidrilico (3458 cm^{-1}) e di una funzione esterea α,β -insatura (1724 cm^{-1} del carbonile, 1252 cm^{-1} del legame C-O).

Il successivo studio dello spettro ^1H NMR ha consentito di individuare una serie di segnali distintivi per la caratterizzazione della struttura diterpenica e le varie funzionalizzazioni presenti su di essa. Nello spettro protonico, a campi alti, sono presenti quattro segnali che risuonano come singoletti a δ_{H} 1.39, δ_{H} 1.60, δ_{H} 1.66, δ_{H} 1.84 inerenti a gruppi CH_3 .

A campi bassi sono invece presenti sei segnali a δ_{H} 6.60 (dd, $J=1.5, 8.6\text{ Hz}$), δ_{H} 6.13 (dd, $J=11.2, 17.5\text{ Hz}$), δ_{H} 5.23 (d, $J=17.5\text{ Hz}$), δ_{H} 5.21 (d, $J=11.2\text{ Hz}$), δ_{H} 5.18 (t, $J=6.8\text{ Hz}$) e δ_{H} 5.13 (t, $J=6.8\text{ Hz}$) imputabili a protoni olefinici. Tali segnali, confrontati con quelli del capsianoside I, hanno consentito di definire lo scheletro di base dell'acido 13-idrossigeranillinalol-16-oico con insaturazioni in posizione 6*E*, 10*E*, 14*E*.

L'analisi combinata dello spettro COSY e TOCSY ha consentito di individuare quattro sequenze di spin per l'aglicone diterpenico. Il primo sistema di spin va dagli H_2 -1 all' H -2; il secondo dagli H_2 -4 all' H -6; il terzo dagli H_2 -8 all' H -10 ed il quarto dagli H_2 -12 all' H -14 indicando, quindi, che il C-3, C-7, C-11 e C-15 sono carboni quaternari.

L'analisi dello spettro ^{13}C NMR evidenzia la presenza di due carboni anomerici a δ_{C} 105.6 e δ_{C} 98.2, di un carbonio idrossimetinico a δ_{C} 67.6, di un carbonio carbonilico a δ_{C} 169.7 e di un gruppo metossilico a δ_{C} 52.1.

Nello spettro protonico risultano, inoltre, ben evidenti a campi bassi i segnali relativi ai protoni anomerici di due unità saccaridiche a δ_H 4.56 e δ_H 4.48. Tali protoni anomerici risuonano come doppietti con una J di 7.7 Hz e ciò è indicativo di unità saccaridiche in forma piranosica e con configurazione β . Dai dati NMR bidimensionali risulta che le due unità saccaridiche sono legate in sequenza tra di loro. L'esperimento HSQC, di correlazione eteronucleare diretta C-H, ha consentito non solo di correlare le risonanze protoniche con quelle dei corrispondenti carboni, ma anche di stabilire che il C-3 è il sito di glicosidazione. Infatti il C-3 risulta spostato a campi bassi, a δ_C 81.8, per effetto della glicosidazione. Il sito di glicosidazione al C-3 è stato anche confermato dall'esperimento HMBC in cui compare un picco di correlazione tra il protone anomerico (δ_H 4.48) ed il C-3 (δ_C 81.8) e tra il CH_3 -20 (δ_H 1.39) ed il C-3 (δ_C 81.8).

Nello spettro protonico è ancora individuabile un multipletto a δ_H 4.54 assegnabile ad un gruppo idrossimetinico, che correla nello spettro HSQC con un carbonio a δ_C 67.6.

Passo seguente è stata la determinazione della catena oligosaccaridica che si è realizzata con l'ausilio di tecniche NMR bidimensionali (COSY, TOCSY, HMBC e HSQC) poiché lo spettro 1H presenta nella zona compresa tra δ_H 3.00 e δ_H 4.00, relativa ai monosaccaridi, numerosi segnali sovrapposti che risultano quindi di difficile interpretazione.

Un primo passo ha previsto la metanolisi acida del prodotto. I metilglicosidi ottenuti, dopo sililazione, sono stati analizzati mediante GC adoperando degli standards di riferimento. Da tale analisi è risultato che il capsianoside I metilestere contiene solo due unità di glucosio.

Per quanto riguarda la definizione dei siti di glicosidazione dell'aglicone, nell'esperimento HMBC sono presenti picchi di correlazione tra il protone anomerico a δ_H 4.48 (Glc I) ed il C-3 dell'aglicone a δ_C 81.8. Ciò ha confermato quindi che la catena oligosaccaridica è legata al C-3 dell'aglicone.

La determinazione della sequenza protonica in ciascuna unità monosaccaridica è stata realizzata mediante l'analisi combinata degli spettri COSY e TOCSY. Sono ben individuabili i segnali dall'H-1 agli H₂-6 per entrambe le unità monosaccaridiche.

L'esperimento HSQC ha consentito non solo di correlare le risonanze protoniche di ciascuno zucchero con quelle dei corrispondenti carboni, ma anche di stabilire quali fossero le posizioni dei legami interglicosidici. Infatti, i carboni impegnati nei legami glicosidici, subiscono uno shift a campi bassi per effetto della glicosidazione e sono quindi facilmente identificabili.

L'esperimento HSQC ha mostrato che il C-2 del Glc I risuona a δ_C 83.0 ppm indicando che subisce un β effetto a causa di una glicosilazione.

L'esperimento HMBC, mettendo in evidenza la correlazioni tra ciascun protone anomero ed il carbonio glicosidato dell'unità monosaccaridica adiacente (J^2 o J^3), ha permesso di stabilire la connessione tra le due unità monosaccaridiche.

Infatti, in tale esperimento, è presente un picco di correlazione tra l'H-1 del Glc II (δ_H 4.56) ed il C-2 del Glc I (δ_C 83.0), indicando che la catena disaccaridica legata al C-3 è costituita da due unità di β -glucosio in cui il Glc II è legato al C-2 del Glc I.

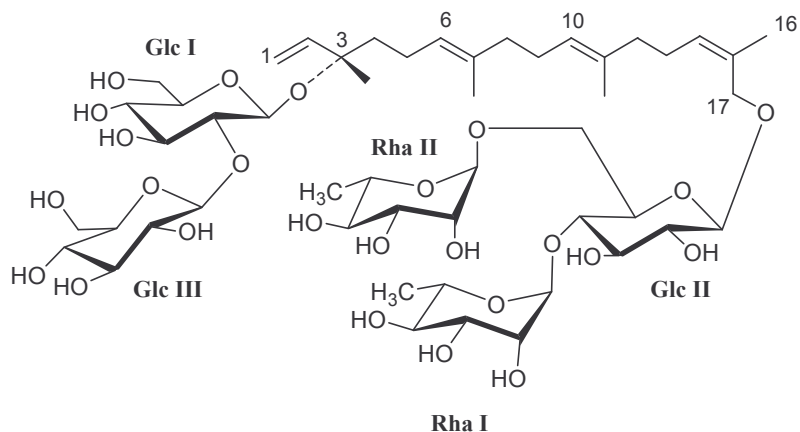
A questo punto rimanevano da definire le stereochimiche al C-3 ed al C-13. Per quanto riguarda la configurazione al C-3 è stata stabilita essere *S* come per gli altri capsianosidi, sulla base del potere rotatorio specifico.

La configurazione assoluta al C-13 è stata stabilita essere *R* sulla base dei dati ottenuti in seguito all'applicazione del metodo di Mosher modificato.

Il capsianoside I metilestere è stato sottoposto inizialmente ad idrolisi enzimatica *Charonia Lampas* a 37°C. per liberarlo dai due monosaccaridi. La miscela è stata purificata usando una cartuccia Sep-Pak lavata con H₂O ed eluita con metanolo ed il residuo solido ottenuto purificato mediante HPLC usando una colonna analitica μ -Bondapack C18 e una miscela MeOH:H₂O 85:15 per dare 2.0 mg del capsianoside I metilestere privato della porzione zuccherina.

L'aglicone ottenuto è stato successivamente esterificato con il (+)- e (-)-MTPA [acido α -metossi- α -trifluorometil-fenilacetico] ed i prodotti ottenuti studiati mediante ¹H-NMR.

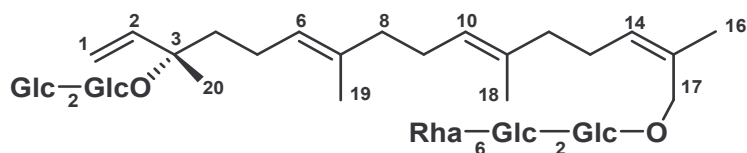
Sulla base dei dati ottenuti il capsianoside I metilestere è stato definito come: **3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil-6*E*, 10*E*, 14*E*-13-idrossi-(3*S*)- geranillinalol-16-ato di metile.**

Capsianoside VIII

Il capsianoside VIII presenta nello spettro di massa FAB ad alta risoluzione (HRFAB-MS) uno ione pseudomolecolare $[M-H]^-$ a m/z 1083.5218 in accordo con una formula molecolare $C_{50}H_{84}O_{25}$. (calcd.: 1083.5223).

L'analisi dello spettro 1H NMR ha consentito di individuare una serie di segnali caratteristici per la caratterizzazione della struttura diterpenica e le varie funzionalizzazioni presenti su di essa. Nello spettro protonico, a campi alti, sono presenti quattro segnali che risuonano come singoletti a δ_H 1.39, δ_H 1.61 (x 2) e δ_H 1.78 inerenti a gruppi CH_3 .

A campi bassi sono, invece, presenti cinque segnali a δ_H 6.14 (dd, $J=11.1, 18.0$ Hz), δ_H 5.41 (t, $J=8.1$ Hz), δ_H 5.25 (d, $J=18.0$ Hz), δ_H 5.21 (d, $J=11.0$ Hz) e δ_H 5.13 (br t, $J=7.2$ Hz) imputabili a protoni olefinici. Tali segnali, confrontati con quelli del capsianoside III hanno consentito di definire lo scheletro di base del 17-idrossigeranillinalolo con insaturazioni in posizione 6*E*, 10*E*, 14*Z*.



Capsianoside III

L'analisi combinata dello spettro COSY e TOCSY ha consentito di individuare quattro sequenze di spin per l'aglicone diterpenico. Il primo sistema di spin va dagli H_2 -1 all' H -2; il secondo dagli H_2 -4 all' H -6; il terzo dagli H_2 -8 all' H -10 ed il quarto dagli H_2 -12 all' H -14 indicando, quindi, che il C-3, C-7, C-11 e C-15 sono carboni quaternari.

Nello spettro protonico risultano, inoltre, ben evidenti, a campi bassi, i segnali relativi ai protoni anomerici di cinque unità saccaridiche a δ_H 4.82, δ_H 4.71, δ_H 4.54, δ_H 4.46, δ_H 4.21. Tre monosaccaridi risuonano come doppietti con una J compresa tra 7.6 e 7.8 Hz, ciò è indicativo di unità saccaridiche in forma piranosica e con configurazione β . I restanti due monosaccaridi presentano un protone anomero che risuona come singoletto indicando quindi una configurazione di tipo α . Dai dati di NMR bidimensionali risulta che le cinque unità saccaridiche non sono legate in sequenza ma si collocano in due diverse posizioni della catena diterpenica.

L'esperimento HSQC, di correlazione eteronucleare diretta C-H, ha consentito non solo di correlare le risonanze protoniche con quelle dei corrispondenti carboni, ma anche di stabilire che il C-3 era sito di una glicosidazione. Infatti il C-3 risulta spostato a campi bassi, a δ_C 81.0, per effetto della glicosidazione. Il sito di glicosidazione al C-3 è stato anche confermato dall'esperimento HMBC in cui compare un picco di correlazione tra il CH₃-20 (δ_H 1.39) ed il C-3 (δ_C 81.0).

Nello spettro protonico sono ancora individuabili due doppietti a δ_H 4.34 e δ_H 4.13 assegnabili ad un CH₂-O, che dallo spettro COSY sono risultati essere accoppiati solo tra di loro e nello spettro HSQC correlano con un carbonio a δ 67.4. Poiché risultano fortemente spostati a campi bassi, lasciano presupporre la presenza di una ulteriore glicosilazione in tale posizione.

L'analisi degli zuccheri è stata effettuata sottoponendo il capsianoside VIII a metanolisi acida ed i metil glicosidi ottenuti, dopo sililazione, sono stati analizzati mediante GC adoperando degli standards di riferimento. Da tale analisi è risultato che il capsianoside contiene glucosio e ramnosio in rapporto 3:2. Infatti nello spettro ¹³C NMR sono ben evidenti i segnali relativi ai cinque carboni anomerici a δ_C 102.5, δ_C 101.4, δ_C 105.7, δ_C 98.3, δ_C 101.9.

La presenza nell'esperimento HMBC di picchi di correlazione tra il protone anomero a δ_H 4.46 (Glc I) ed il C-3 dell'aglicone e tra il protone anomero a δ_H 4.21 (Glc II) ed il C-17, hanno confermato la presenza di due catene oligosaccaridiche legate al C-3 e al C-17 dell'aglicone.

La determinazione della sequenza protonica in ciascuna unità monosaccaridica mediante TOCSY ha confermato la presenza di tre unità di glucosio (sistema di spin da dall'H-1 agli H₂-6) e due unità di ramnosio (sistema di spin da dall' H-1 al CH₃-6).

L'esperimento HSQC ha consentito non solo di correlare le risonanze protoniche di ciascuno zucchero con quelle dei corrispondenti carboni, ma anche di stabilire quali fossero

le posizioni dei legami interglicosidici. Infatti i carboni impegnati nei legami glicosidici, subiscono uno shift a campi bassi per effetto della glicosidazione e sono quindi facilmente identificabili. Poiché dai precedenti dati spettrali erano stati individuati due siti di glicosilazione in posizione C-3 e C-17 dell'aglicone, è stato necessario valutare indipendentemente le due sequenze saccaridiche. La catena legata al C-3 dell'aglicone presentava una correlazione (HMBC) tra il C-3 e il protone anomero del Glc I a δ_H 4.46.

Il successivo esperimento HSQC ha mostrato che il C-2 del Glc I risuona δ_C 83.0 ppm indicando che subisce un β effetto a causa di una glicosilazione. L'esperimento HMBC di correlazione eteronucleare C-H attraverso due o tre legami ha permesso di stabilire la connessione delle differenti unità monosaccaridiche. Esso mette in evidenza le correlazioni che si realizzano tra ciascun protone anomero ed il carbonio glicosidato dell'unità monosaccaridica adiacente (J^2 o J^3).

Nell'esperimento HMBC, sono presenti picchi di correlazione tra l'H-1 del Glc III (δ_H 4.54) ed il C-2 del Glc I (δ_C 83.0), indicando che la catena saccaridica legata al C-3 è costituita da due unità di β -glucosio in cui il Glc III va a legarsi al C-2 del Glc I (Fig. 32).

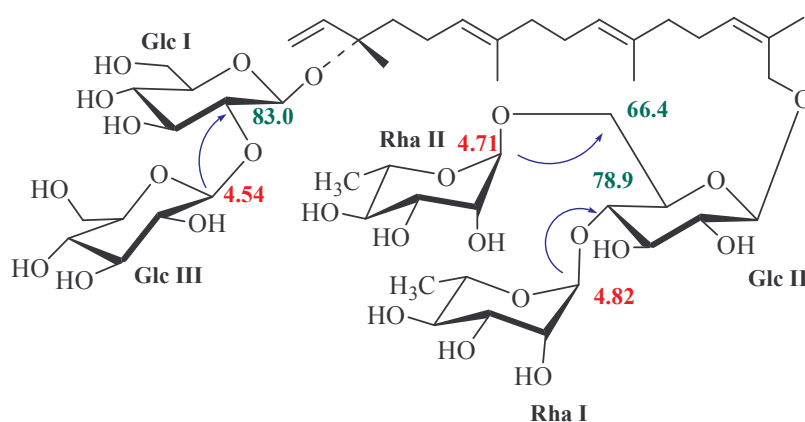


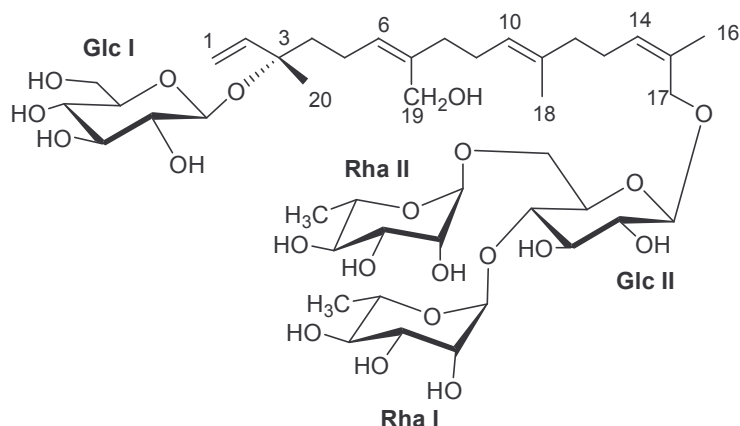
Figura 32. Legami interglicosidici

La seconda catena oligosaccaridica è legata al C-17 come risulta dall'esperimento HMBC in cui è evidente il picco di correlazione tra il C-17 (δ_C 66.4 ppm) e il protone anomero a δ_H 4.71 assegnato al Glc II (Fig.32). Dai dati di HSQC, il C-4 ed il C-6 del Glc II subiscono un β -effetto, mentre il C-3 ed il C-5 del Glc II subiscono un γ -effetto in confronto ai dati di ^{13}C NMR di un glucosio non sostituito indicando così che le posizioni 4 e 6 sono siti di glicosilazione. Il ramnosio I e il ramnosio II non presentano nessuno shift di glicosidazione e quindi sono stati posti come zuccheri terminali.

La conferma che le due unità di ramnosio siano effettivamente legate al Glc II è scaturita dai dati di HMBC in cui sono presenti picchi di correlazione tra l'H-1 del Rha I (δ_H 4.82) ed il C-4 del Glc II (δ_C 78.9) e l'H-1 del Rha II (δ_H 4.71) ed il C-6 del Glc II (δ_C 66.4). (Fig.32).

Questi ultimi dati hanno indicato la presenza di una unità di glucosio con una doppia ramificazione, caratteristica strutturale mai ritrovata in precedenza nei capsianosidi isolati dal *Capsicum*. La configurazione al C-3 è stata stabilita essere *S* come per gli altri capsianosidi, sulla base del potere rotatorio specifico.

Sulla base di questi dati il capsianoside VIII può essere definito come: **3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil- 17-idrossi-6*E*, 10*E*, 14*Z*-(3*S*)-geranillionalolo-17-O-[α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)]-{ α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)}}- β -D-glucopiranoside.**

Capsianoside IX

Il capsianoside IX presenta nello spettro di massa FAB (ioni negativi) uno ione pseudomolecolare a m/z 937 $[M-H]^-$. Nello spettro di massa sono anche presenti altri due ioni a m/z 792 $[(M-H) - 146]^-$ m/z 646 $[792 - 146]^-$ che indicavano la perdita di due unità di deossiesoso.

L'analisi dello spettro 1H NMR ha consentito di individuare una serie di segnali caratteristici per la caratterizzazione della struttura diterpenica e le varie funzionalizzazioni presenti su di essa. Nello spettro protonico, a campi alti, sono presenti tre segnali che risuonano come singoletti a δ_H 1.39, δ_H 1.62 e δ_H 1.78 inerenti a gruppi CH_3 .

A campi bassi sono, invece, presenti cinque segnali a δ_H 5.95 (dd, $J=11.0$, 17.1 Hz), δ_H 5.40 (t, $J=8.1$ Hz), δ_H 5.30 (t, $J=7.2$ Hz), δ_H 5.25 (sovrapposto con altri segnali), δ_H 5.21 (sovrapposto con altri segnali) e δ_H 5.15 (sovrapposto con altri segnali) imputabili a protoni olefinici. Tali segnali, confrontati con quelli del capsianoside III hanno consentito di definire lo scheletro di base del 17-idrossigeranillinalolo con insaturazioni in posizione 6*E*, 10*E*, 14*Z*.

Una differenza sostanziale tra il capsianoside IX ed il capsianoside III risiede nella mancanza, nello spettro 1H NMR, del segnale relativo al metile 19. Nello spettro protonico, compare un segnale, risuonante come singoletto ed integrante per due protoni, a δ_H 4.08. Tale segnale è risultato essere accoppiato nello spettro HSQC con un carbonio a δ_C 59.7. Tale dato ha fatto ipotizzare che il metile 19 fosse sostituito da una funzione idrossimetilica. La posizione di tale funzione idrossimetilica al C-19 è stata confermata sia dall'analisi dello spettro HMBC che mostrava picchi di correlazione tra gli H_2 -19 (δ_H 4.08) ed il C-7 (δ_C 139.4), il C-6 (δ_C 129.3) e il C-8 (δ_C 36.0) sia dallo shift a campi bassi (a causa della presenza del gruppo ossidrilico) del C-6, C-7 e C-8 rispetto ai valori riportati per il capsianoside III.

L'analisi combinata dello spettro COSY e TOCSY ha consentito di individuare quattro sequenze di spin per l'aglicone diterpenico. Il primo sistema di spin va dagli H₂-1 all'H-2; il secondo dagli H₂-4 all'H-6; il terzo dagli H₂-8 all'H-10 ed il quarto dagli H₂-12 all'H-14 indicando, quindi, che C-3, C-7, C-11 e C-15 sono carboni quaternari.

Nello spettro protonico risultano, inoltre, ben evidenti, a campi bassi, i segnali relativi ai protoni anomerici di quattro unità saccaridiche a δ_H 4.83, δ_H 4.72, δ_H 4.37, δ_H 4.22. Due monosaccaridi risuonano come doppietti con una J di 7.6 Hz, e ciò è indicativo di unità saccaridiche in forma piranosica e con configurazione β . I restanti due monosaccaridi presentano un protone anomero che risuona come singoletto indicando quindi una configurazione di tipo α . Dai dati di NMR bidimensionali risulta che le quattro unità saccaridiche non sono legate in sequenza ma si collocano in due diverse posizioni della catena diterpenica.

L'analisi degli zuccheri è stata effettuata sottoponendo il capsianoside IX a metanolisi acida ed i metil glicosidi ottenuti, dopo sililazione, sono stati analizzati mediante GC adoperando degli standards di riferimento. Da tale analisi è risultato che il capsianoside contiene glucosio e ramnosio in rapporto 2:2. Nello spettro ¹³C NMR sono ben evidenti i segnali relativi ai quattro carboni anomerici a δ_C 102.7, δ_C 102.1, δ_C 101.6, δ_C 99.5. La determinazione della sequenza protonica in ciascuna unità monosaccaridica mediante TOCSY ha confermato la presenza di due unità di glucosio (sistema di spin da dall'H-1 agli H₂-6) e due unità di ramnosio (sistema di spin da dall' H-1 al CH₃-6).

L'esperimento HSQC, di correlazione eteronucleare diretta C-H, ha consentito non solo di correlare le risonanze protoniche con quelle dei corrispondenti carboni, ma anche di stabilire che il C-3 era sito di una glicosidazione. Infatti, il C-3 risulta spostato a campi bassi, a δ_C 81.3, per effetto della glicosidazione. Il sito di glicosidazione al C-3 è stato anche confermato dall'esperimento HMBC in cui compaiono picchi di correlazione tra il C-3 (δ_C 81.3) con il CH₃-20 (δ_H 1.39) ed il protone anomero a δ_H 4.37 (Glc I).

Nello spettro protonico sono ancora individuabili due doppietti fortemente spostati a campi bassi, a δ_H 4.33 e δ_H 4.13 assegnabili ad un CH₂-O, che dallo spettro COSY sono risultati essere accoppiati solo tra di loro e correlano nello spettro HSQC con un carbonio a δ_C 67.4. La correlazione J³ tra il protone anomero a δ_H 4.22 (Glc II) ed il C-17 conferma che le due posizioni di glicosidazione sono C-3 e C-17.

Analizzando i dati di HSQC, del Glc II si nota che il C-4 ed il C-6 subiscono un β -effetto, mentre il C-3 ed il C-5 del Glc II subiscono un γ -effetto in confronto ai dati di ¹³C NMR di un glucosio non sostituito indicando così che le posizioni 4 e 6 sono siti di

glicosilazione. Il ramnosio I e il ramnosio II non presentano nessuno shift di glicosidazione e quindi sono stati posti come zuccheri terminali.

La conferma che le due unità di ramnosio siano effettivamente legate al Glc II è scaturita dai dati di HMBC in cui sono presenti picchi di correlazione tra l'H-1 del Rha I (δ_H 4.83) ed il C-4 del Glc II (δ_C 79.3) e l'H-1 del Rha II (δ_H 4.72) ed il C-6 del Glc II (δ_C 66.9) (Fig. 33).

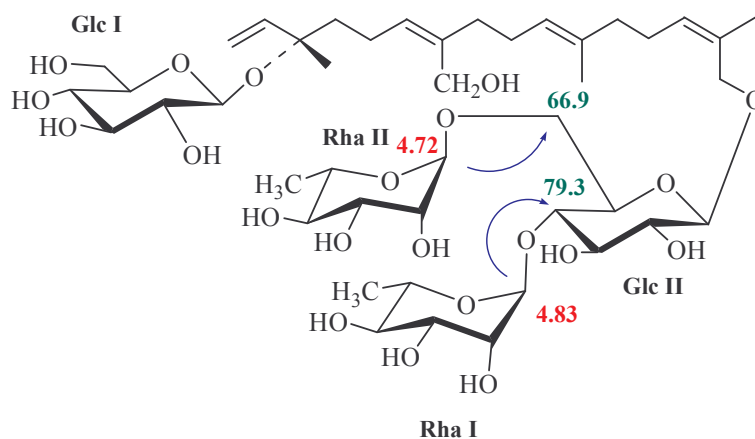
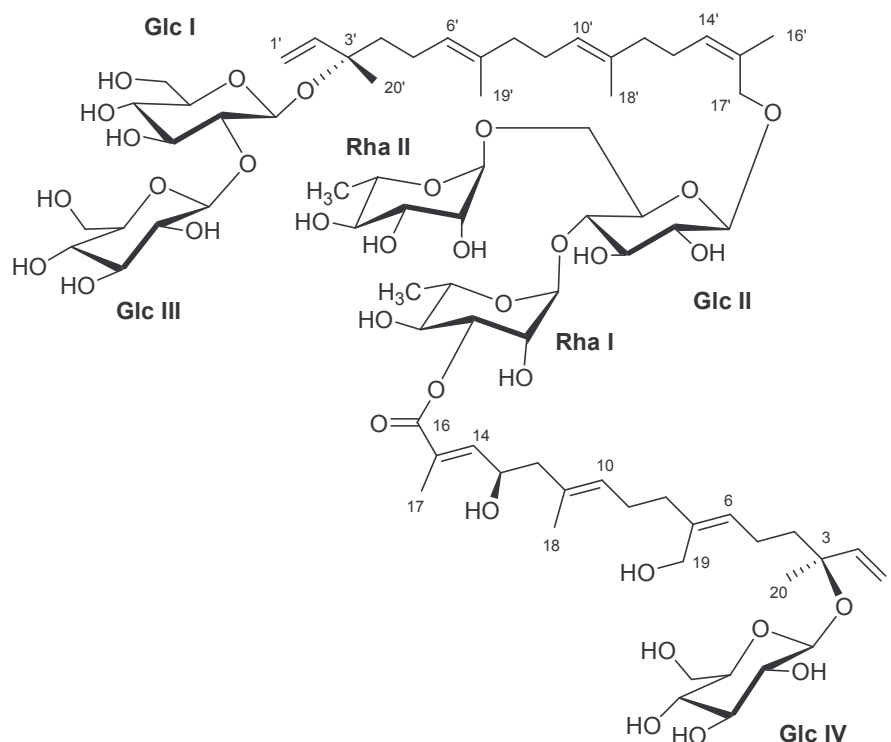


Figura 33. Legami interglicosidici

Questi ultimi dati hanno indicato la presenza di una unità di glucosio con una doppia ramificazione, caratteristica strutturale mai ritrovata in precedenza nei capsianosidi isolati dal *Capsicum*. La configurazione al C-3 è stata stabilita essere *S* come per gli altri capsianosidi, sulla base del potere rotatorio specifico.

Sulla base di questi dati il capsianoside IX può essere definito come: **3-O- β -D-glucopiranosil- 17-idrossi-6*E*, 10*E*, 14*Z*-(3*S*)-geranillionalolo-17-O-[α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)]-{ α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)}]- β -D-glucopiranoside.**

Capsianoside L



L'analisi dello spettro di massa FAB ha evidenziato uno ione pseudomolecolare $[M-H]^-$ a m/z 1579 e picchi di frammentazione a m/z 1083 $[(M-H) - 496]^-$ e m/z 921 $[1083 - \text{esoso}]^-$. m/z 775 $[1083 - \text{deossiesoso}]^-$ m/z 467 $[1083 - \text{esoso} - \text{deossiesoso}]^-$.

Lo spettro IR ha indicato la presenza di un gruppo ossidrilico (3438 cm^{-1}) e di due funzioni esteree α,β -insature (1715 cm^{-1} e 1647 cm^{-1}).

Lo spettro ^{13}C NMR mostra ben 76 segnali (Tabella 12) ed in particolare 6 carboni anomerici a δ_C 98.3, δ_C 99.4, δ_C 101.6, δ_C 102.1, δ_C 102.6, δ_C 105.7 successivamente correlati ai corrispettivi protoni anomerici mediante un esperimento HSQC (δ_H 4.48, δ_H 4.36, δ_H 4.72, δ_H 4.21, δ_H 4.83, δ_H 4.56).

Molto interessante è soprattutto il δ_C 169.6 tipico di un C carbonilico estereo che suggeriscono una struttura correlata ad altri Capsianosidi (A-H) precedentemente isolati e costituita da un estere dimerico di diterpeni aciclici glicosilati.

L'analisi degli zuccheri è stata effettuata sottoponendo il capsianoside L a metanolisi acida ed i metil glicosidi ottenuti, dopo sililazione, sono stati analizzati mediante GC adoperando degli standards di riferimento. Da tale analisi è risultato che il capsianoside contiene D-glucosio e L-ramnosio in rapporto 4:2.

La determinazione della sequenza protonica in ciascuna unità monosaccaridica è stata realizzata mediante l'analisi combinata degli spettri COSY e TOCSY mentre un'attenta analisi degli spettri HSQC e HMBC hanno permesso, confrontando i dati con quelli di capsianosidi noti, di definire la struttura delle singole unità di terpeniche.

In particolare si notavano tutti i segnali del Capsianoside VIII, descritto in precedenza, e quindi di un'unità di terpenica legata in C-3' al Glc I (legato poi in posizione 2 al GlcIII) e in C-17' al Glc II a sua volta legato a due unità di ramnosio (Rha I e Rha II). In aggiunta sono risultati evidenti i segnali di un *6E*, *10E*, *14E*-geranillinalol legato in 3 ad un'unità di glucosio (GlcIV) come evidenziato dal cross-peak del H-1 (Glc IV) δ_H 4.36 con C-3 (δ_C 81.3) osservato nello spettro HMBC.

L'analisi di 1H NMR e 1H - 1H COSY da H₂-1 a H₃-20 hanno mostrato la presenza di tre metili (H₃-17, H₃-18 e H₃-20) un ossimetino (δ_H 4.56), un ossimetilene (δ_H 4.09) ed una serie di protoni olefinici.

La presenza dei due gruppi ossidrilici nelle posizioni 13 e 19 è stata supportata dalle correlazioni J^2 e J^3 di H-13 (δ_H 4.55) con C-14 (δ_C 129.0) e C-12 (δ_C 47.7) e di H₂-19 (δ_H 4.09) con C-6 (δ_C 129.3), C-7 (δ_C 139.3), C-8 (δ_C 35.6).

Inoltre i cross-peaks di H₃-17 (δ_H 1.89) con C-16 (δ_C 169.6), e C-15 (δ_C 145.0) e di H-14 (δ_H 6.72) con C-17 (δ_C 13.2) hanno definito il C carbonilico estereo come il C-16.

L'analisi combinata degli spettri COSY e TOCSY ha evidenziato una notevole differenza tra Rha I e Rha II e lo spostamento a campi bassi di H-3 (Rha I) a δ_H 4.68 (δ_C 75.6) ha indicato che il C-3 di Rha I è coinvolto nel legame estereo con il diterpene. Si notavano, inoltre, shift di acetilazione alle posizioni 2 e 4 di Rha I [H-2 (δ_H 4.00; δ_C 70.2) e H-4 (δ_H 3.58; δ_C 71.6)].

La correlazione HMBC tra C-16 (δ_C 169.6) del diterpene e H-3 (δ_H 4.68) di RhaI ha confermato la posizione del legame estereo.

La configurazione al C-3 e C-3' è stata stabilita essere *S* come per gli altri capsianosidi, sulla base del potere rotatorio specifico.

La configurazione assoluta al C-13 è stata stabilita essere *R* sulla base dei dati ottenuti in seguito all'applicazione del metodo di Mosher modificato.

Altri metaboliti isolati

Oltre ai quattro nuovi capsianosidi descritti, anche molti altri metaboliti secondari (Fig. 35) sono stati isolati dal *Capsicum Annuum* L. Particolarmente interessante è stato lo studio dell' **ossilipina**.

Le ossilipine sono metaboliti secondari che svolgono un importante ruolo difensivo nelle piante, sintetizzati enzimaticamente nel pathway della lipossigenasi. Lo studio della molecola isolata è partito dall' analisi dello spettro ESI-MS in cui si nota uno ione $[M]^-$ con $m/z = 327.0$

Lo spettro ^1H NMR dell'ossilipina isolata (Fig.34) ha mostrato un gruppo metilico (δ_{H} 0.97), quattro protoni olefinici (δ_{H} 5.53, δ_{H} 5.51, δ_{H} 5.39 e δ_{H} 5.35), tre segnali relativi a CH_2O (δ_{H} 4.59, dd, 1H), (δ_{H} 3.47, ddd, 1H), (δ_{H} 3.41, dd, 1H) e molti protoni metilenici che risuonano tra δ_{H} 1.35 e δ_{H} 2.99.

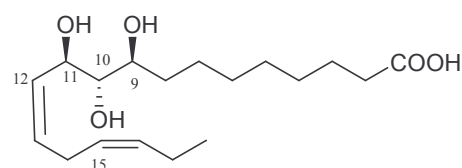


Figura 34. L'ossilipina isolata

Lo spettro ^{13}C NMR ha indicato la presenza di un carbonile (δ_{C} 178.2), e confermato la presenza di carboni olefinici e metilenici.

L'analisi di ^1H - ^1H -COSY e TOCSY ha evidenziato la presenza di una catena a C 18 da H_3 -18 a H_2 -6, con insaturazioni in 12(Z) e 15(Z). La posizione del gruppo carbossilico è stata determinata dal cross-peak nell'esperimento HMBC tra il carbossile a δ_{C} 178.2 con i protoni metilenici a δ_{H} 2.27 (H_2 -2), mentre quella delle tre funzioni ossidriliche a C-9, C-10 e C-11 è supportata da cross-peaks tra H-10 (δ_{H} 3.41)/C-11, C-12, C-9, C-8, e tra H-9 (δ_{H} 3.47)/ C-10, C-11, C-8, C-7.

La posizione del doppio legame è supportata dalla correlazione osservata per H_2 -14 con H-15 e H-13. La geometria Z del doppio legame si è ricavata dalla costante d'accoppiamento ($J=12.1$ Hz) tra H-12 e H-13, mentre una varietà molto complessa di segnali è stata notata per H-15 e H-16. La geometria Z è stata assegnata sulla base di chemical shift a campi alti nello spettro ^{13}C NMR.

L' ipotesi suggerita di una configurazione 9(S),10(S),11(R) è stata fatta dopo l'applicazione del metodo di Murata, analisi configurazionale basata sulla costante d'accoppiamento per l'elucidazione della stereochimica relativa in strutture acicliche con 1,2 centri chirali usando i valori $J^3_{\text{H-H}}$ e $J^{2,3}_{\text{C-H}}$, di HMBC phase-sensitive in combinazione con dati ROE.

Questo approccio ha permesso la determinazione del rotamero predominante lungo gli assi C9-C10 e C10-C11. L'osservazione di una grande (*anti*) $J^3_{\text{H-H}}$ tra H-9 e H-10 ha definito un arrangiamento anti protone-protone. Il rotamero *eritro* con configurazione C/C-*anti* è stato proposto perché nessun ROE è stato osservato tra H-9 e H-10.

Nel nostro caso, esperimenti ROE hanno rivelato una prossimità spaziale per H-8 e H-10, H-10 e H-15 ed allo stesso modo per H-11 e H-14. Tali dati sono stati supportati da grandi $J^2_{\text{C10-H9}}$ (-4.6 Hz) e $J^2_{\text{C9-H10}}$ (-5.4 Hz). Per la porzione C10-C11 l'osservazione di una piccola $J^3_{\text{H10-H11}}$ (*gauche*), grande $J^2_{\text{C10-H11}}$ e di una piccola $J^2_{\text{C11-H10}}$ (-2.1) sono in linea con la stereochimica proposta. Sulla base dei dati su menzionati l'ossilipina è stata definita come acido **9(*S*),10(*S*),11(*R*)-triidrossi-12(*Z*),15(*Z*) ottadecadienoico**.

Per gli altri composti isolati, la determinazione strutturale è stata fatta per paragone dei dati spettroscopici (NMR mono- e bi- dimensionali) e spettrometrici con i dati riportati in letteratura.

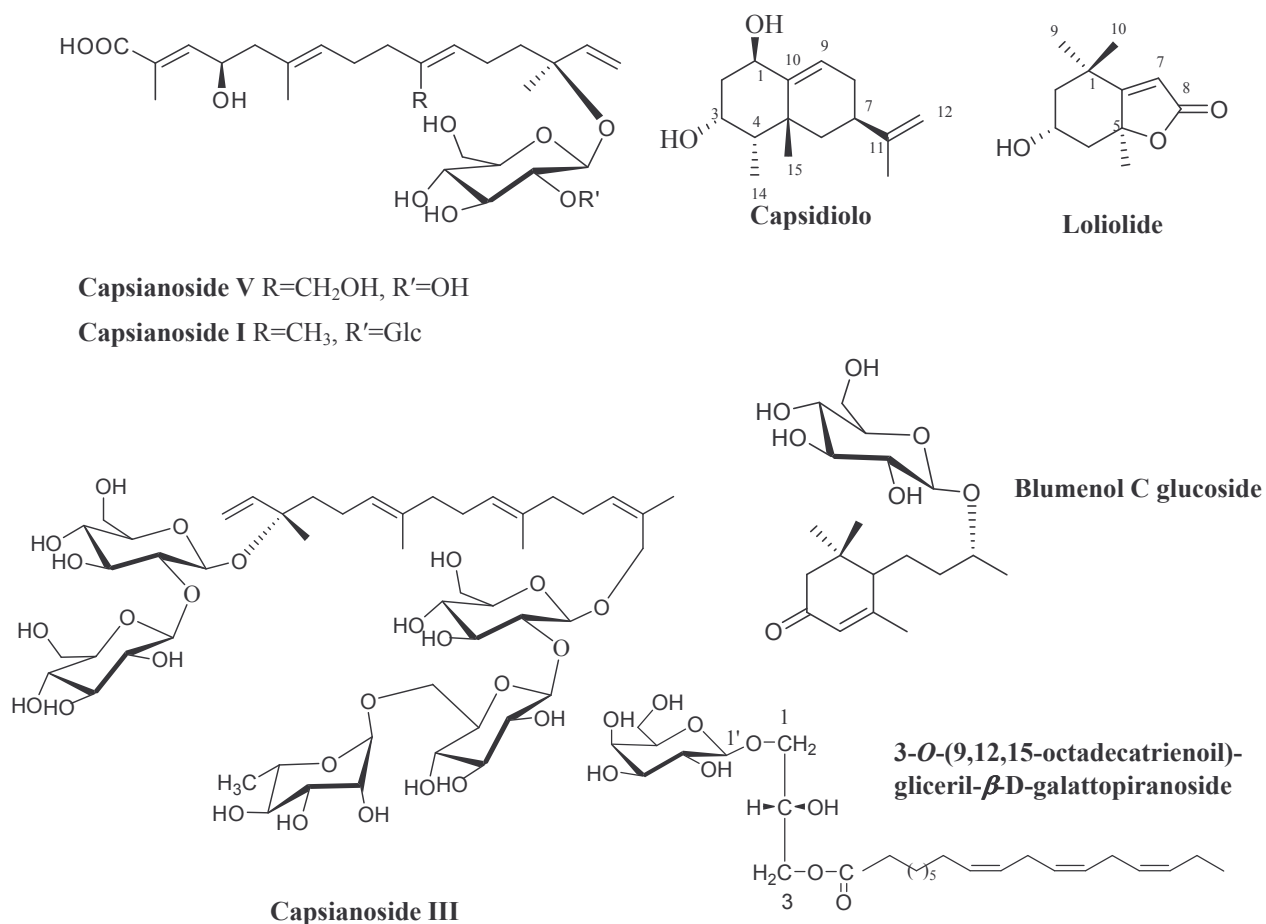


Figura 35. Altri metaboliti isolati

Tabella 11. ^1H e ^{13}C NMR (CD_3OD , 500 e 125 MHz) dei Capsianosidi VIII, IX e I metil-
estere.

	Capsianoside VIII		Capsianoside IX		Capsianoside I metil-estere	
Posizione	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}
1	5.25 d ($J=18.0$), 5.21 d ($J=11.1$)	115.7	5.25 ^b , 5.21 ^b	115.8	5.23 d ($J=17.5$), 5.21 d ($J=11.2$)	115.7
2	6.14 dd ($J=11.1, 18.0$)	144.2	5.95 dd ($J=11.0, 17.1$)	144.5	6.13 dd ($J=11.2, 17.5$)	144.5
3	-	81.0	-	81.3	-	81.8
4	1.61 ^b	42.8	2.30 ^b , 1.63 ^b	42.9	1.60 ^b	42.7
5	2.06 ^b	23.3	2.17 ^b	23.2	2.06 ^b	23.3
6	5.13 br t ($J=7.2$)	125.6	5.30 t ($J=7.2$)	129.3	5.13 t ($J=6.8$)	125.6
7	-	135.9	-	139.4	-	135.5
8	1.98 ^b	40.6	2.13 ^b	36.0	1.98 ^b	40.3
9	2.06 ^b	27.5	2.13 ^b	27.9	2.08 ^b	27.4
10	5.13 br t ($J=7.2$)	125.6	5.15 ^b	126.0	5.18 t ($J=6.8$)	129.0
11	-	135.0	-	135.7	-	131.1
12	2.01 ^b	40.6	2.02 t ($J=7.7$)	40.9	2.30 dd ($J=6.9, 13.5$), 2.13 dd ($J=6.9, 13.5$)	47.6
13	2.18 m	27.1	2.19 ^b	27.3	4.54	67.6
14	5.41 t ($J=8.1$)	131.1	5.40 t ($J=8.1$)	131.3	6.60 dd ($J=1.5, 8.6$)	128.6
15	-	132.1	-	132.4	-	144.9
16	1.78 s	21.6	1.78 s	21.9	-	169.7
17	4.34 d ($J=11.5$), 4.13 d ($J=11.5$)	67.4	4.33 d ($J=11.2$), 4.13 d ($J=11.2$)	67.7	1.84 s	12.7
18	1.61 s	16.0	1.62 s	16.3	1.66 s	16.4
19	1.61 s	16.0	4.08 s	59.7	1.60 s	15.8
20	1.39 s	23.2	1.39 s	23.2	1.39 s	23.1
-OCH ₃					3.74 s	52.1
Glc I						
1	4.46 d ($J=7.7$)	98.3	4.37 d ($J=7.6$)	99.5	4.48 d ($J=7.7$)	98.2
2	3.44 ^b	83.0	3.19 ^b	75.2	3.43 ^b	83.0
3	3.50 t ($J=9.0$)	77.8	3.31 ^b	78.2	3.52 ^b	77.8
4	3.32 ^b	71.3	3.28 ^b	71.7	3.34 ^b	71.3
5	3.18 ^b	77.3	3.16 ^b	77.6	3.19 ^b	77.3
6a	3.79 ^b ,		3.82 ^b ,		3.81 dd ($J=11.9, 2.3$),	
6b	3.63 ^b	62.3	3.65 ^b	62.8	3.63 dd ($J=11.9, 5.6$)	62.5
Glc II						
1	4.21 d ($J=7.8$)	101.9	4.22 d ($J=7.6$)	102.1		
2	3.20 ^b	75.0	3.22 ^b	75.2		
3	3.44 ^b	76.5	3.44 ^b	76.7		
4	3.56 t ($J=9.4$)	78.9	3.58 t ($J=9.2$)	79.3		
5	3.38 ^b	75.2	3.39 ^b	75.4		
6	3.93 ^b , 3.61 ^b	66.4	3.93 ^b , 3.63 ^b	66.9		
Glc III						
1	4.54 d ($J=7.6$)	105.7			4.56 d ($J=7.7$)	105.6
2	3.25 ^b	76.4			3.25 ^b	76.3
3	3.26 ^b	78.1			3.27 ^b	77.9
4	3.33 ^b	71.4			3.37 ^b	71.4
5	3.37 ^b	77.4			3.38 ^b	77.5
6a	3.80 ^b ,				3.83 dd ($J=11.9, 2.5$),	
6b	3.70 ^b	62.3			3.70 dd ($J=11.9, 5.0$)	62.5
Rha I						
1	4.82 s	102.5	4.83 s	102.7		
2	3.83 ^b	72.2	3.83 ^b	72.2		
3	3.65 ^b	72.0	3.65 ^b	72.0		
4	3.39 ^b	73.7	3.40 ^b	73.5		
5	4.00 ^b	70.3	4.00 ^b	70.3		
6	1.26 d ($J=6.6$)	17.7	1.26 d ($J=6.1$)	17.8		
Rha II						
1	4.71 s	101.4	4.72 s	101.6		
2	3.85 ^b	72.0	3.85 ^b	72.0		
3	3.69 ^b	72.1	3.69 dd ($J=9.6, 3.3$)	72.1		
4	3.36 ^b	73.6	3.38 ^b	73.6		
5	3.72 ^b	69.6	3.74 ^b	69.6		
6	1.28 d ($J=6.6$)	17.8	1.28 d ($J=6.1$)	18.1		

^aCostanti d'accoppiamento (in Hz) sono in parentesi; ^bSegnali sovrapposti (overlapped)

Tabella 12. ^1H e ^{13}C NMR (CD_3OD , 500 e 125 MHz) del Capsianoside L

Capsianoside L					
posizione	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}	posizione	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}
1	5.21 ^b , 5.25 ^b	115.8	1'	5.23 ^b	115.8
2	5.95 dd ($J=17.7, 11.0$)	144.5	2'	6.14 dd ($J=17.6, 10.9$)	144.5
3	-	81.3	3'	-	81.4
4	1.64 ^b	42.8	4'	1.62 ^b	42.8
5	2.16 ^b	23.5	5'	2.06	23.3
6	5.31 ^b	129.3	6'	5.13 brt	125.7
7	-	139.3	7'	-	135.7
8	2.13 ^b	35.6	8'	2.00 ^b	40.5
9	2.09 ^b	28.0	9'	2.11 ^b	27.7
10	5.14 ^b	128.9	10'	5.13 brt	125.7
11	-	131.5	11'	-	135.5
12	2.30 ^b , 2.15 ^b	47.7	12'	2.02 ^b	40.6
13	4.55 m	67.7	13'	2.19 ^b	27.3
14	6.72 dd ($J=8.6, 1.5$)	129.0	14'	5.41 ^b	131.0
15	-	145.0	15'	-	132.3
16	-	169.6	16'	1.78 s	21.8
17	1.89 s	13.2	17'	4.34 d ($J=11.5$), 4.13 d ($J=11.5$)	67.3
18	1.68 s	16.5	18'	1.62 s	16.3
19	4.09 ^b	59.8	19'	1.62 s	16.3
20	1.38 s	23.1	20'	1.39 s	23.4
Glc I			Glc IV		
1	4.48 d ($J=7.6$)	98.3	1	4.36 d ($J=7.6$)	99.4
2	3.44 ^b	83.1	2	3.18 ^b	75.2
3	3.50 ^b	78.0	3	3.30 ^b	78.0
4	3.31 ^b	71.5	4	3.28 ^b	71.7
5	3.19 ^b	77.5	5	3.17 ^b	77.5
6	3.81 ^b , 3.63 ^b	62.5	6	3.82 ^b , 3.64 ^b	62.8
Glc II			Rha I		
1	4.21 d ($J=8.0$)	102.1	1	4.83 s	102.6
2	3.21 ^b	75.0	2	4.00 d ($J=3.0$)	70.2
3	3.45 ^b	77.0	3	4.68 dd ($J=10.0, 3.0$)	75.6
4	3.56 ^b	78.0	4	3.58 ^b	71.6
5	3.38 ^b	75.2	5	4.02 ^b	70.1
6	3.95 ^b , 3.65 ^b	66.8	6	1.28 d ($J=6.3$)	18.1
Glc III			Rha II		
1	4.56 d ($J=7.5$)	105.7	1	4.72 s	101.6
2	3.24 ^b	76.5	2	3.85 ^b	72.1
3	3.26 ^b	78.1	3	3.70 ^b	72.2
4	3.35 ^b	71.2	4	3.37 ^b	73.8
5	3.37 ^b	77.4	5	3.76 ^b	69.7
6	3.83 ^b , 3.70 ^b	62.8	6	1.29 d ($J=6.3$)	

^aCostanti d'accoppiamento (in Hz) sono in parentesi; ^bSegnali sovrapposti (overlapped)

Attività farmacologica

Dei quattro nuovi prodotti isolati, purtroppo a causa dell'esigue quantità raccolte, è stato possibile studiare l'attività antiossidante unicamente, per il Capsianoside VIII.

Il test DPPH, e il dosaggio TBARS effettuati oltre che per il Capsianoside VIII anche per i noti Capsianoside III, Capsianoside V, e 3-*O*-(9,12,15-octadecatrienil)-gliceril- β -D-galattopiranoside non hanno però evidenziato risultati di rilievo.

Decisamente più interessanti sono stati i risultati ottenuti dallo studio dell'attività anti *Helicobacter Piloni* del capsidiolo.

L'*Helicobacter Piloni* (Fig. 36) è un batterio scoperto nel 1983 che colonizza la mucosa protettiva dello stomaco e del duodeno danneggiandola. Può essere trasmesso da un individuo ad un altro per via oro-orale attraverso la saliva oppure per via oro-fecale attraverso l'ingestione di alimenti contaminati dalle feci dei portatori. La pericolosità del batterio risiede non solo nel fatto che esso provoca gastriti croniche e ulcera peptica, ma anche per il fatto che è uno dei responsabili principali del cancro allo stomaco.

La terapia d'elezione per pazienti affetti da *Helicobacter pilori* prevede l'associazione di antibiotici (metronidazolo, ciprofloxacina, furazolidone, ecc..) inibitori irreversibili della pompa protonica gastrica (omeprazolo), ed antiacidi (sali di bismuto).

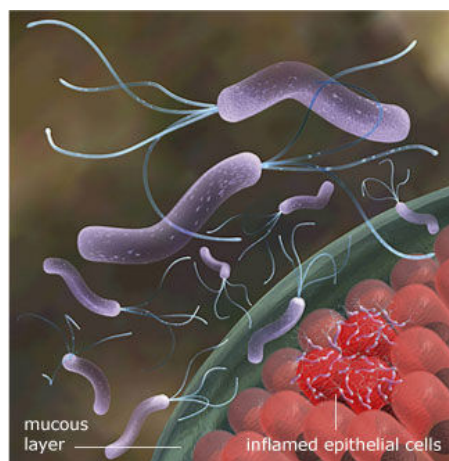


Figura 36. Attacco dell'*Helicobacter pilori* sulle cellule epiteliali dello stomaco

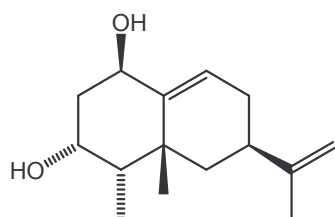
Il diffuso uso di antibiotici, però, ha portato ad un incremento della resistenza del batterio, e questo problema ha reso necessario lo studio di nuove molecole.

Negli ultimi anni, quindi, contrariamente alle consuete prescrizioni mediche che, in caso di gastriti croniche ed ulcere peptiche, raccomandano la totale astensione da cibi piccanti, con l'indiscussa scoperta che queste patologie sono causate da un'infezione

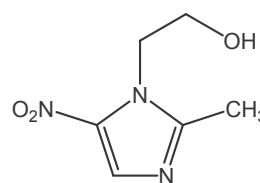
batterica, si è tentato di sfruttare le qualità terapeutiche, e più precisamente quelle antibiotiche, del *Capsicum annuum* L.

Il capsidiolo, ha mostrato proprietà batteriostatiche alla concentrazione minima inibente (MIC) di 200 µg/ml, valore inferiore a quello del metronidazolo (MIC=250 µg/ml) antibiotico d'elezione nella terapia anti- *Helicobacter pylori*.

Inoltre, studi sulla specie DSMZ 4867 del batterio, che è resistente al commerciale antibiotico, si è constatata una chiara attività antimicrobica del capsidiolo che lo rende una valida alternativa nel trattamento dell'ulcera peptica.



capsidiolo



metronidazolo

Gli stessi studi sono stati fatti anche per il loliolide, senza però ottenere alcun risultato di rilievo.

Tutti i saggi sono stati effettuati presso il Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali e Zootecniche, Università degli Studi di Perugia.

FOENICULUM VULGARE M.



Il *Foeniculum vulgare* e le sue virtù sono conosciute fin dal periodo dell'Impero Romano.

E' una pianta tipica della macchia mediterranea, molto utilizzata nell'antichità per la conservazione di derrate alimentari e per il caratteristico aroma dei suoi semi.

Descrizione Botanica

È una pianta erbacea perenne o biennale appartenente alla famiglia delle Ombrellifere con portamento alto e slanciato, che può superare i due metri di altezza.

Dotato di una robusta radice ingrossata a fuso, il fusto ha la superficie striata longitudinalmente, e di forma cilindrica e ramoso. La foglia, lunga 40-50 cm e larga 10-12 cm è di colore grigio-verde ed è attaccata al fusto mediante una guaina.

I fiori (Fig.37) sono raggruppati in ombrelle terminali, prive di involucro e involucretto con 4-30 raggi, hanno un piccolo calice e la loro corolla è composta da cinque petali gialli di forma ovale, con l'apice ripiegato verso il centro. La fioritura avviene in estate.



Figura 37. Fiori di *Foeniculum vulgare*

Il frutto, è fortemente aromatico, composto da due acheni verdastri, ovoidali, lunghi fino ad 1 cm, ristretti all'apice e alla base con cinque costole verticali sulla superficie esterna.

Il *Foeniculum vulgare* ama le colline esposte al sole, i luoghi asciutti, le regioni costiere e quelle sub-montane e ha la caratteristica di avere differenti periodi balsamici a seconda della parte presa in esame. Il frutto ha il massimo contenuto, in termini di principio attivo, fra agosto e settembre; le foglie in primavera e le radici fra ottobre e novembre.

Composizione

Il componente principale del *foeniculum vulgare* è rappresentato dall'olio essenziale,⁵⁸ composto per il 50-70% da trans-anetolo⁵⁹, e per il 20% da (+)-fencone, fencone e feniculina. Sono presenti, inoltre, cumarine (umbelliferone, bergaptene, psoralene, scoparone, seselina, imperatorina, marmesina); metilcavicolo, anisaldeide ed alcuni idrocarburi terpenici, tra cui α -pinene, α -fellandrene e limonene.

I frutti⁶⁰ contengono olio grasso, proteine ed acidi organici. Fra i flavonoidi presenti nel *foeniculum vulgare*, i più rappresentati sono la quercetina 3-glucuronide, l'isoquercitina, la quercetina 3-arabinoside, il kampferolo 3-glucuronide e 3-arabinoside, e la isoramnetina glucoside.

Attività farmacologica

Numerose sono le attività farmacologiche, vere e presunte, attribuite nel corso dei secoli al *foeniculum vulgare*. Di particolare interesse sono l'attività:

- ✓ tonica uterina - usato principalmente per alleviare i sintomi della menopausa, per migliorare la funzione mestruale⁶¹ e per ridurre la sensazione di nausea.⁶²
- ✓ galattogoga - agisce sul sistema endocrino e sulla funzione ormonale stimolando la secrezione di latte nelle donne post-parto.
- ✓ diuretica⁶³ - disintossica l'organismo stimolando la produzione di urina; aiuta a sciogliere i calcoli renali ed a rimuovere dall'organismo l'umidità e il grasso in eccesso.
- ✓ depurativa - purifica il sangue.
- ✓ carminativa⁶⁴ - l'olio essenziale agisce sulla muscolatura liscia dell'intestino, regolarizzando la motilità e riducendo al tempo stesso la produzione intestinale di gas.
- ✓ aromatica⁶⁵ - I suoi semi stimolano l'appetito, favoriscono la digestione e bloccano i processi fermentativi intestinali; sono utili anche per sedare dolori addominali e frenare vomito e singhiozzo.
- ✓ anti-spasmodica⁶⁶ - agisce sul sistema nervoso⁶⁷ grazie alla sua abilità di prevenire o alleviare gli spasmi muscolari.
- ✓ anti-infiammatoria⁶⁸ - l'infuso può essere usato per curare le congiuntiviti e le infiammazioni delle palpebre (blefarite).

- ✓ epatoprotettiva⁶⁹ - tonifica il fegato e rafforza i sistemi di disintossicazione
- ✓ espettorante - estratti acquosi di anetolo e fencolo svolgono attività secretolitica a livello delle vie respiratorie.
- ✓ calmante per la bronchite e la tosse. Si usa come ingrediente per dare sapore dolce ai rimedi per la tosse.
- ✓ la sua essenza ha attività batteriostatica.⁷⁰

Il *Foeniculum vulgare*, svolge, inoltre, una blanda azione estrogena, quindi non va somministrato a donne alle quali sia stato sconsigliato l'uso della pillola e allo stesso tempo anche a chi fa uso di anticoncezionali orali e terapie ormonali perché l'interazione può potenziare gli effetti estrogenici.

L'olio essenziale, infine, può causare nausea, vomito, convulsioni e va usato solo sotto controllo del medico che all'insorgenza di disordini gastrici e diarrea, può ridurne le dosi o addirittura interrompere il trattamento. Non va somministrato in caso di flogosi del tratto gastro-intestinale e non va assunto per periodi prolungati, perché può provocare in soggetti predisposti manifestazioni allergiche a carico della cute e delle vie respiratorie.

In cosmesi si usa il succo di finocchietto come emolliente e idratante per l'allestimento di preparazioni destinate a soggetti con pelle a tendenza grassa, stanca ed avvizzita.

I semi sono utilizzati per la preparazione di paste dentifrice e masticati che concorrono a contrastare l'alito cattivo.

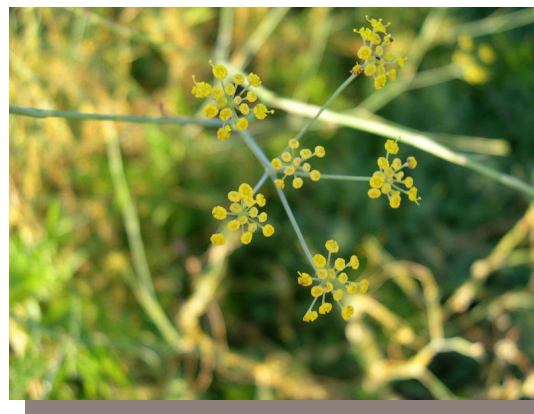
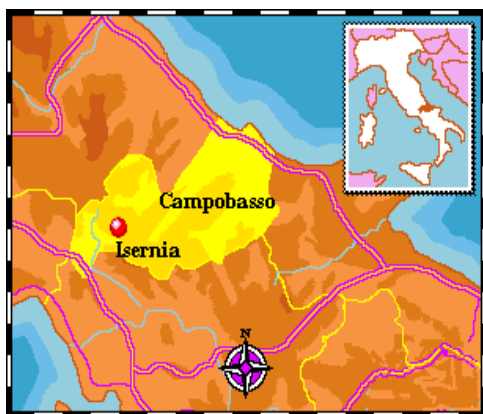
Uso in cucina

I giovani getti e le foglie fresche dei finocchi sono indicati per aromatizzare insalate, minestre, piatti di pesce, salse e aceti aromatici. Nei semi è presente l'anetolo che è alla base del suo aroma tipico, per questo si utilizza per insaporire carni, salumi, formaggi, pane, dolci e castagne bollite.

Apporta un tocco di rustica genuinità, tanto che molti buongustai tengono segreti i luoghi dove le piante allignano per sfruttarle per i loro condimenti. I semi vengono consumati crudi o aggiunti a ogni tipo di salsina per condimento o ancora impiegati per una tisana digestiva e aromatica gradevolissima. Vengono poi utilizzati sopra il pane fatto in casa o su alcune focacce, nelle minestre e come condimento per piatti di pesce, nei quali il loro sapore prepotente domina le altre spezie.

Estrazione ed isolamento

La mia attività di ricerca è stato incentrata sullo studio dell'estratto butanologico dei semi del *Foeniculum vulgare* M.. Tale pianta è stata raccolta nel settembre del 2004 nelle zone montuose del Molise (località Campobasso).



I semi della pianta *Foeniculum vulgare* M. (225 g), precedentemente triturati, sono stati estratti con MeOH (1,5 litri) per tre volte a temperatura ambiente sotto agitazione. L'estratto metanolico (18 g) così ottenuto, è stato concentrato sotto vuoto ed il residuo solido è stato sottoposto alla metodica di Kupchan che prevede la ripartizione tra solventi a polarità crescente (*n*-esano, CCl₄, CHCl₃ e *n*-BuOH).

L'estratto *n*-butanologico (6,8 g) è stato frazionato mediante cromatografia contro corrente a goccia (DCCC), utilizzando in modo discendente un sistema ternario a due fasi costituito da *n*-BuOH/Me₂CO/H₂O (3:1:5) ad una velocità di flusso di 18 ml/h.

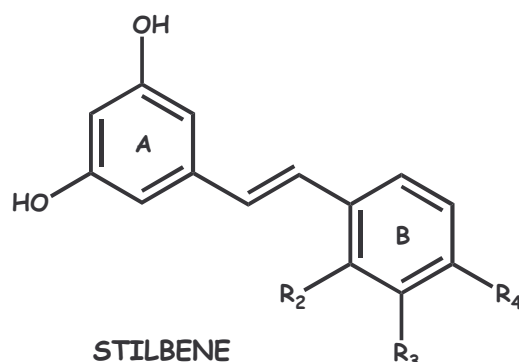
In base al comune comportamento cromatografico su TLC, le frazioni ottenute sono state raggruppate utilizzando come miscele eluenti *n*-BuOH/HOAc/H₂O (12:3:5) e CHCl₃/MeOH/H₂O (80:18:2).

La frazione 386-392 (8.6 mg) è stata ulteriormente purificata mediante HPLC su colonna C18 Luna analitica utilizzando, come eluente una miscela di MeOH/H₂O (45:55) conducendo all'isolamento del noto *cis*-miabenolo C.

Le frazioni 334-344 (19,3 mg) e 318-328 (43,4 mg) sono state sottoposte ad uno stadio finale di purificazione mediante, invece, HPLC su colonna C18 μ -Bondapak analitica usando, come eluente, una miscela di MeOH/H₂O (35:65) e portando all'isolamento di due nuovi analoghi strutturali del *cis*-miabenolo C denominati **Foeniculoside X** (1.5 mg; *rt*=33min.) e **Foeniculoside XI** (1.2 mg; *rt*=36min.).

Il *cis*-miabenolo C, è un trimero dello stilbene isolato per la prima volta nel 1987 da *Carex fedia myabei* dal gruppo di ricerca del prof. Mizutani.⁷¹

Gli stilbeni sono 1,2 diarileteni in cui l'anello A presenta due gruppi ossidrilici in posizione *-meta* mentre l'anello B è caratterizzato da sostituzioni di gruppi ossidrilici o metossilici in posizione *-orto*, *-meta*, e/o *-para*.



Dal punto di vista biogenetico (schema 5), gli stilbeni hanno origine dall'acido cinnamico e dai suoi derivati, ed in particolare il pattern di sostituzione dell'acido cinnamico originario determina modifiche sull'anello B dello stilbene sintetizzato.

Gli stilbeni sono ampiamente diffusi nel mondo vegetale in forma monomerica ed oligomerica (dimeri, trimeri e tetrameri) e ad essi sono attribuiti una notevole varietà di attività farmacologiche.

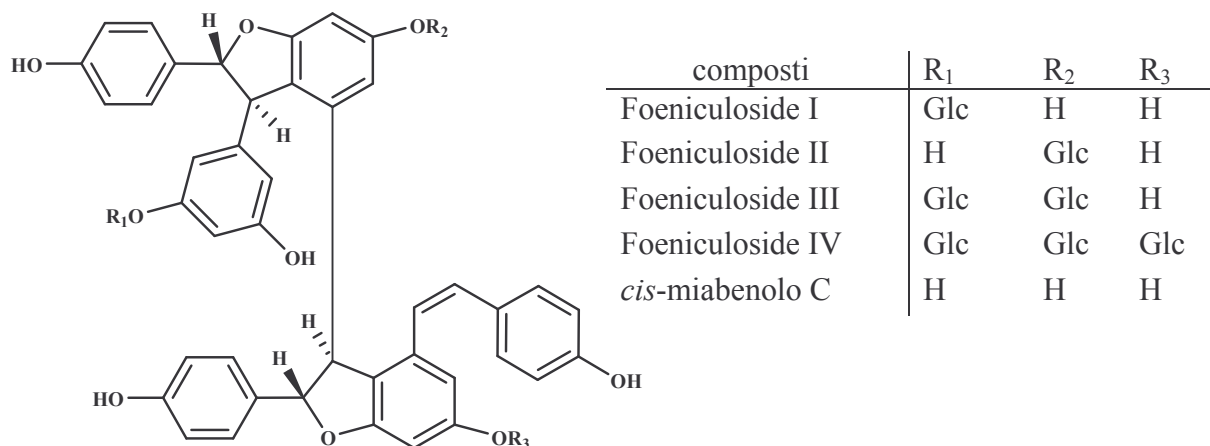
<i>R2'</i>	<i>R3'</i>	<i>R4'</i>	<i>Phenolic acid</i>	<i>Stilbene</i>
H	H	H	Cinnamic acid	Pinosylvin
H	H	OH	<i>p</i> -Coumaric acid	Resveratrol
OH	H	OH	2',4'-Dihydroxycinnamic acid	Hydroxyresveratrol
H	OH	OH	Caffeic acid	Piceatannol
H	OH	OCH ₃	Isoferulic acid	Rhapontigenin

Schema 5. *Acidi fenolici e stilbeni corrispondenti*

Il *cis*-miabenolo C, in particolare, presenta una potente azione antinfiammatoria ed un interessante attività citotossica che sembra essere legata ad una attività inibitoria della proteina chinasi C⁷² come evidenziato da lavori su linee cellulari tumorali di polmone.

Nel 1994 dai frutti di *Foeniculum Vulgare* M. sono stati isolati dal gruppo di ricerca del prof. Niiho, quattro derivati mono- e di- glicosidati caratterizzati dalla presenza di molecole di D-glucosio legati a gruppi ossidrilici nelle posizioni 11a, 13b ed 11c (Schema 6).

Il Foeniculoside XI, si differenzia da quelli noti, per la presenza di due differenti unità di glucosio in posizione 11a e 13c. Il Foniculoside X, invece, rappresenta il primo derivato diglucosilato in posizione 11a, in cui due unità di D-glucosio sono legate tra loro tramite un legame 4- β -glicosidico.



Schema 6. Foeniculosidi isolati nel 1994

Lo studio delle altre frazioni ottenute dalla cromatografia controcorrente a goccia DCCC ha permesso l'isolamento di **trans-miabeno C**⁷³ (1.4mg) e **resveratrol 3-O-β-D-glucopiranoside**⁷⁴ (1.6mg) e, soprattutto, di un nuovo metabolita secondario definito come **(3'R)-5-idrossi-3-(3' idrossibutil) isobenzofuran-1-(3H)-one**. Composti con struttura simile erano stati in precedenza isolati anche dalla *Murraya koenigii*, ma mai individuati in precedenza dal *Foeniculum vulgare*.

Oggetto del mio studio è stata poi la fase acquosa (3.5 g) che è stata sottoposta a cromatografia con Amberlite XAD-7, usando in successione H₂O 100%, MeOH-H₂O (1:1) e MeOH 100% ottenendo tre differenti frazioni. La seconda e la terza frazione sono state ulteriormente purificate su colonna C18 μ-Bondapak analitica usando, come eluente, una miscela di MeOH/H₂O (20:80) ottenendo così **sinapil glucoside**⁷⁵ (5.1 mg) e **siringina**⁷⁶ (2.5 mg).

Successivamente è stata esaminata anche la fase CCl₄ (3.2g) che è stata caricata su una colonna MPLC usando gel di silice come fase stazionaria ed eluendo a gradiente con 0-100% *n*-esano-EtOAc ed infine con MeOH 100%.

Le frazione sono state riunite in base al comune comportamento su TLC utilizzando come miscele eluente CHCl₃/MeOH/H₂O (80:18:2). La frazione 47-58 (*n*-esano-EtOAc 75:25), la frazione 59-83 (*n*-esano-EtOAc 7:3) e la frazione 128-142 (*n*-esano-EtOAc 55:45) sono state ulteriormente purificate su colonna C18 μ-Bondapak analitica usando (30 cm x 3.9 mm; i.d) , come eluente, una miscela di MeOH-H₂O (85:15) ottenendo **acido oleanolico**⁷⁷

(7.3 mg; da 47-58) il composto **A**⁷⁸ e **2,3-diidrossipropil octadec-6-enoato**⁷⁹ (0.9 mg e 1.2 mg rispettivamente da 59-83) e **7 α -idrossicampesterolo**⁸⁰ (0.7 mg, da 128-142) (Figura 38).

Tutti i metaboliti secondari isolati sono stati caratterizzati usando spettrometria di massa e tecniche di risonanza magnetica nucleare mono e bidimensionali.

Successivamente saggi di attività farmacologica hanno permesso di definire la loro capacità antiossidante.

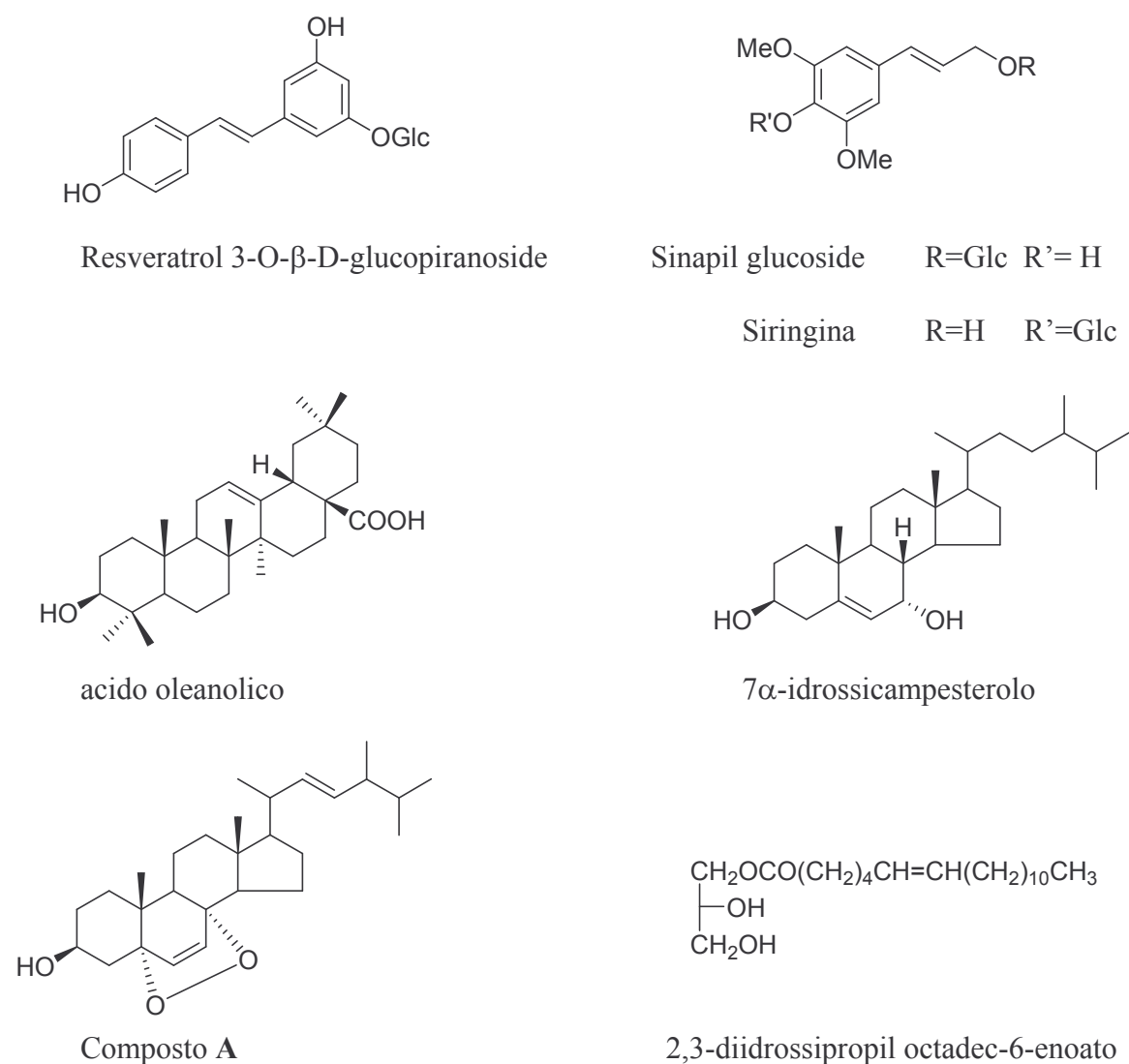
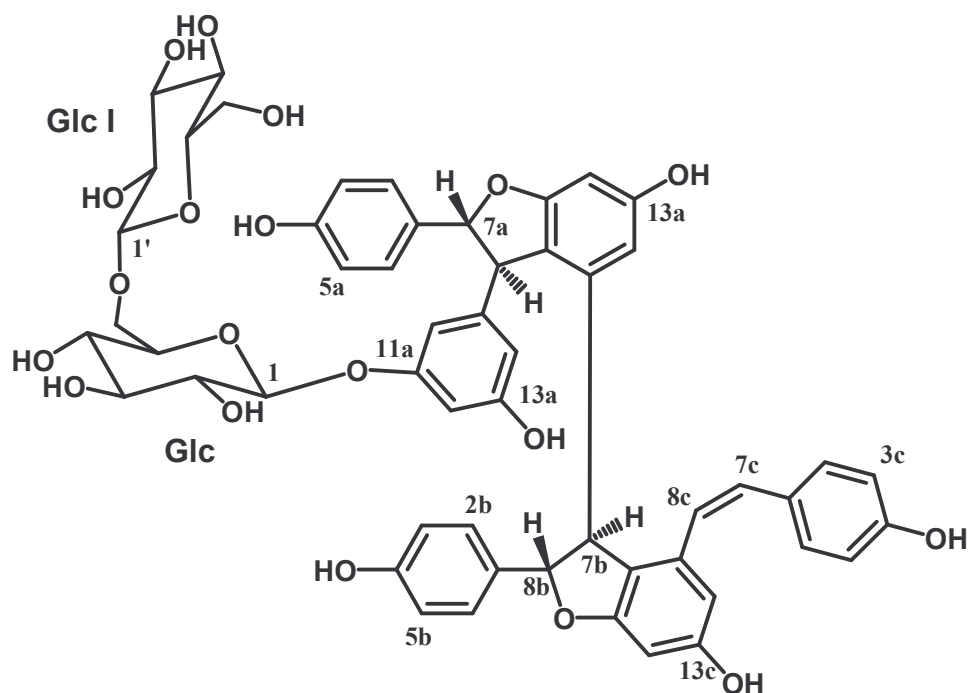


Figura 38. *Composti noti isolati dai semi di Foeniculum vulgare*

Foeniculoside X

L'analisi dello spettro di massa FAB ad alta risoluzione (HRFAB-MS) ha evidenziato uno ione pseudomolecolare $[M + H]^+$ a m/z 1005.3088 in accordo con una formula molecolare $C_{54}H_{52}O_{19}$ (calcd. 1005.3103), mentre nello spettro di massa FAB (ioni negativi) era evidente uno ione pseudomolecolare a m/z 1003 $[M - H]^-$ ed un frammento a m/z 679 $[(M-H) - 2 \text{ esosi}]^-$.

L'analisi dello spettro 1H NMR ha consentito di individuare una serie di segnali caratteristici di un trimetro dello stilbene e segnali relativi a due unità monosaccaridiche.

Per quanto riguarda le due unità monosaccaridiche, nello spettro protonico sono ben evidenti, a campi bassi a δ_H 4.70 (d, $J = 7.6$ Hz) e δ_H 4.39 (d, $J = 7.7$ Hz) i segnali relativi ai due protoni anomeric.

Dall'analisi delle costanti di accoppiamento abbiamo intuito che si trattava di due monosaccaridi in forma piranosidica e con configurazione β . Tali protoni, risultano essere accoppiati nello spettro HSQC con due carboni rispettivamente a δ_C 101.4 e δ_C 104.5 ppm.

Per quanto riguarda l'identificazione dei due zuccheri, il foeniculoside X è stato sottoposto a metanolisi acida ed i metil glucosidi ottenuti, dopo sililazione, sono stati analizzati mediante GC adoperando degli standard di riferimento. Da tale analisi è risultato che il foeniculoside X contiene solo due unità di glucosio.

L'analisi combinata degli spettri COSY e TOCSY ha consentito di effettuare l'esatta sequenza dei segnali protonici in ciascuna delle due unità monosaccaridiche. Nell'esperimento TOCSY il trasferimento di coerenza, tra tutti i protoni appartenenti ad uno

stesso sistema di spin, genera una serie di segnali di correlazione, che mostrano su sezioni orizzontali dello spettro 2D i segnali protonici delle singole unità monosaccaridiche a partire dal protone anomero. Lo spettro TOCSY del foeniculoside mostra, infatti, allineati orizzontalmente tutti i sistemi di spin dei due monosaccaridi e ne consente un'accurata identificazione. Quindi per le due unità di glucosio è stato possibile effettuare la sequenza di spin dagli H-1 agli H₂-6.

Una volta effettuata l'intera sequenza di spin delle due unità di glucosio bisognava definire se questi fossero legati in sequenza tra di loro o legati in posizioni diverse sull'aglicone.

L'esperimento HSQC ha consentito di correlare le risonanze protoniche di ciascun zucchero con quelle dei corrispondenti carboni, ma anche di stabilire quali fossero le posizioni dei legami interglicosidici. Infatti, i carboni impegnati nei legami glicosidici subiscono uno shift a campi bassi per effetto della glicosidazione e sono quindi facilmente identificabili. L'esperimento HSQC ha mostrato che il C-6 del Glu I risuona a δ_C 68.6 ppm indicando che subisce un β -effetto a causa della glicosidazione.

In un glucosio non sostituito il C-6 risuona a ≈ 62 ppm. Ulteriore conferma del sito di glicosidazione al C-6 si è avuta anche dall'analisi dello spettro HMBC. Infatti, in tale spettro è presente un picco di correlazione tra l'H-1' del Glu II (δ_H 4.39) ed il C-6 del Glu I (δ_C 68.6 ppm) (Figura 39). Le due unità di glucosio risultano quindi legate tra loro attraverso un legame di tipo $\beta(1 \rightarrow 6)$.

Per quanto riguarda l'aglicone, nello spettro 1H NMR sono presenti sei protoni aromatici con accoppiamento orto [δ_H : 7.08 ($J = 8.5$ Hz) H-2(6)a; δ_H 6.82 ($J = 8.5$ Hz) H-3(5)a; δ_H 6.33 ($J = 8.4$ Hz) H-2(6)b; δ_H 6.50 ($J = 8.4$ Hz) H-3(5)b; δ_H 6.61 ($J = 8.6$ Hz) H-2(6)c; δ_H 6.44 ($J = 8.6$ Hz) H-3(5)c], assegnabili a tre 4-idrossifenoli. Inoltre sempre a campi bassi sono presenti i segnali relativi a sistemi 3,5-diidrossifenolici.

Sempre nello spettro 1H NMR ritroviamo quattro protoni metinici a due a due accoppiati (di cui uno che risuona a campi più bassi in quanto protone ossimetinico) a δ_H 5.21 (H-7a)/ δ_H 4.11 (H-8a) e δ_H 5.23 (H-7b)/ δ_H 3.76 (H-8b). Oltre a tali segnali sono presenti anche due segnali a δ_H 5.66 (H-7c) e δ_H 5.81 (H-8c) relativi a protoni olefinici.

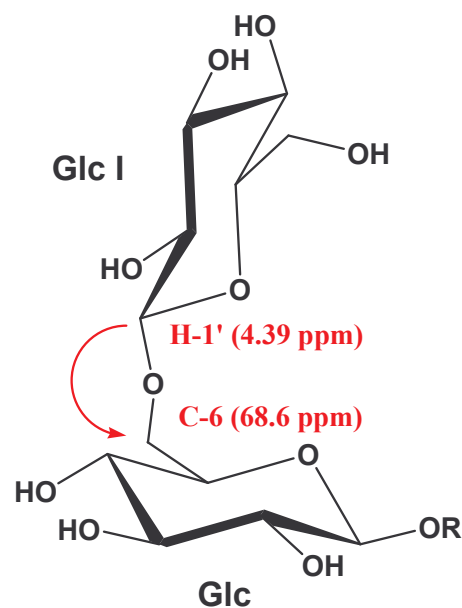


Figura 39. Legame interglicosidico

Questi dati hanno indicato la presenza di due anelli tetraidrofuranici sostituiti e di un doppio legame.

Questa struttura risulta essere simile a quella del *cis*-miabenolo C, nel 1987⁵ da *Carex fedia myabei* dal gruppo di ricerca del prof. Mizutani.

Possiamo considerare il foeniculoside X costituito da tre zone contenenti nuclei aromatici: A, B e C. In particolare i valori di chemical shifts e i valori delle costanti di accoppiamento osservate nel foeniculoside X per le zone A e C sono molto simili a quelli riscontrati nel *cis*-miabenolo C.

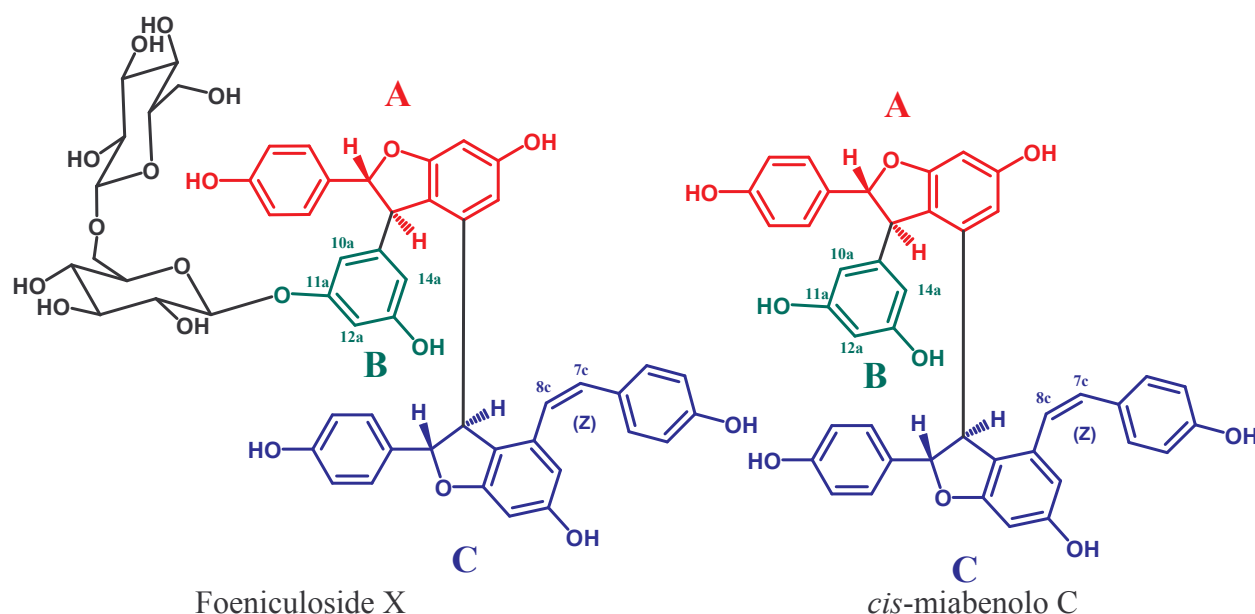


Figura 40. Foeniculoside X e *cis*-miabenolo C

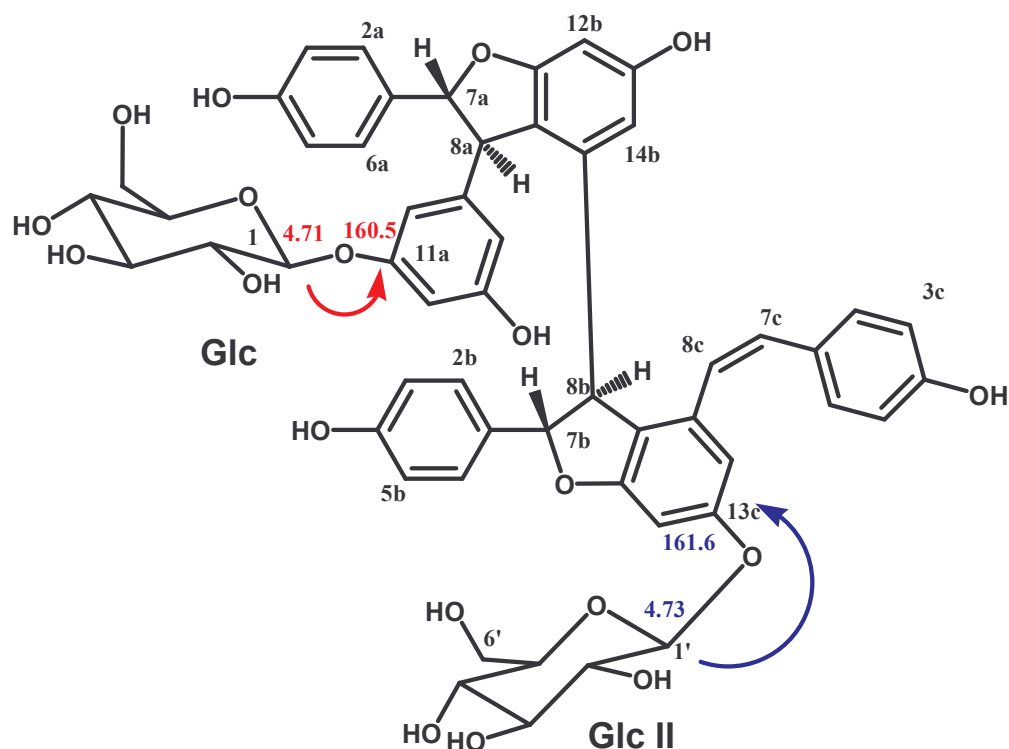
Sono però evidenti delle differenze sostanziali rispetto al *cis*-miabenolo C, per quanto riguarda il sistema aromatico nella zona B. Tali differenze riguardano i protoni 10a, 12a e 14a ed i carboni 12a e 14a che risultano spostati a campi bassi rispetto a quelli riscontrati nel *cis*-miabenolo C. In particolare quello che subisce lo shift più intenso è l'H-12a che risuona a δ_H 6.38 nello spettro protonico del foeniculoside X mentre nello spettro del *cis*-miabenolo C risuona a δ_H 6.08. Ciò ha fatto supporre che il C-11a fosse un sito di glicosidazione. La conferma si è avuta anche in questo caso grazie all'analisi dello spettro HMBC nel quale compare un picco di correlazione J^3 tra l'H-1 del Glu I (δ_H 4.70) ed il C-11a (δ_C 160.2 ppm) dell'aglicone. Ciò ha indicato che si trattava di un trimetro dello stilbene diglicosidato.

La stereochimica relativa è stata assegnata tramite un esperimento ROESY. Si sono osservati, in tale esperimento, picchi di correlazione ROE tra l'H-7a e l'H-10(14)a, l'H-8a e

l'H-2(6)a, l'H-8b e l'H-2(6)b e l'H-7b e l'H-14b che hanno indicato una configurazione *trans* dei protoni H-7a/H-8a e H-7b/H-8b.

Restava a questo punto da definire la geometria del doppio legame 7c-8c nella zona C. Dall'analisi della costante di accoppiamento $J_{H7c-H8c}$ di 12 Hz abbiamo dedotto che si trattava di un doppio legame con geometria *cis* così come riscontrato nel *cis*-miabenolo C.

Sulla base di questi dati il **foeniculoside X** può essere definito come: **11a-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranoside cis-miabenolo C.**

Foeniculoside XI

Il foeniculoside XI presenta nello spettro di massa FAB ad alta risoluzione (HRFAB-MS) uno ione pseudomolecolare $[M + H]^+$ a m/z 1005.3226 in accordo con la formula molecolare $C_{54}H_{52}O_{19}$ (calcolato 1005.3181) mentre nello spettro di massa FAB (ioni negativi) è presente uno ione pseudomolecolare a m/z 1003 $[M - H]^-$ e due frammenti a m/z 841 $[M - H - \text{esoso}]^-$ e a m/z 679 $[M - H - \text{esoso}]^-$.

L'analisi dello spettro 1H NMR ha consentito di individuare una serie di segnali caratteristici di un trimero dello stilbene e segnali relativi a due unità monosaccaridiche.

Per quanto riguarda le due unità monosaccaridiche, nello spettro protonico sono ben evidenti, a campi bassi a $\delta_H = 4.71$ (d, $J = 7.8$ Hz) e $\delta_H = 4.73$ (d, $J = 7.8$ Hz) i segnali relativi ai due protoni anomERICI.

Dall'analisi delle costanti di accoppiamento abbiamo intuito che si trattava di due monosaccaridi in forma piranosidica e con configurazione β .

Tali protoni, risultano essere accoppiati nello spettro HSQC con due carboni rispettivamente a δ_C 101.1 e δ_C 102.4 ppm.

Per quanto riguarda l'identificazione dei due zuccheri, il foeniculoside XI è stato sottoposto a metanolisi acida ed i metil glicosidi ottenuti, dopo sililazione, sono stati analizzati mediante GC adoperando degli standard di riferimento.

Da tale analisi è risultato che il foeniculoside XI contiene due unità di glucosio.

L'analisi combinata degli spettri COSY e TOCSY ha consentito di effettuare l'esatta sequenza dei segnali protonici in ciascuna delle due unità monosaccaridiche dagli H-1 e l'esperimento HSQC ha consentito di correlare le risonanze protoniche di ciascuno zucchero con quelle dei corrispondenti carboni. Poiché non si è riscontrato nessuno spostamento a campi bassi per effetto della glicosidazione, le due unità di glucosio sono state collocate in posizioni diverse sull'aglicone.

Per quanto riguarda l'aglicone, nello spettro ^1H NMR sono presenti sei protoni aromatici con accoppiamento orto [δ_{H} 7.07 ($J=8.5$ Hz) H- 2(6) a; δ_{H} 6.80 ($J=8.5$ Hz) H - 3(5) a; δ_{H} 6.27 ($J=8.4$ Hz) H - 2(6) b; δ_{H} 6.50 ($J=8.4$ Hz) H - 3(5) b; δ_{H} 6.59 ($J=8.6$ Hz) H - 2(6) c; δ_{H} 6.44 ($J=8.6$ Hz) H - 3(5) c], assegnabili a tre 4-idrossifenoli.

Inoltre sempre a campi bassi sono presenti i segnali relativi a sistemi 3,5-diidrossifenolici.

Sempre nello spettro ^1H NMR ritroviamo quattro protoni metinici a due a due accoppiati (di cui uno che risuona a campi più bassi in quanto protone ossimetinico) a δ_{H} 5.25 (H - 7a)/ δ_{H} 4.10 (H - 8a) e δ_{H} 5.17 (H - 7b)/ δ_{H} 3.77 (H - 8b). Oltre a tali segnali sono presenti anche due segnali a δ_{H} 5.68 (H - 7c) e δ_{H} 5.80 (H - 8c) relativi a protoni olefinici.

Questi dati hanno indicato la presenza di due anelli tetraidrofurani sostituiti e di un doppio legame e quindi di una struttura simile a quella del *cis*-miabenolo C.

Sono però evidenti delle differenze sostanziali per quanto riguarda il sistema aromatico nelle zone B e C. Tali differenze riguardano i protoni 10a, 12a, 14a ed i carboni 12a e 14a che risultano spostati a campi bassi rispetto a quelli riscontrati nel *cis*-miabenolo C. In particolare, quello che subisce lo shift più intenso è l'H-12a che risuona a δ_{H} 6.33 nello spettro protonico del foeniculoside XI mentre nello spettro del *cis*-miabenolo C risuona a δ_{H} 6.08. Ciò ha fatto supporre che il C-11a fosse un sito di glicosidazione. La conferma si è avuta grazie all'analisi dello spettro HMBC nel quale compare un picco di correlazione J^3 tra l'H-1 del Glu (δ_{H} 4.71) ed il C-11 (δ_{C} 160.5 ppm) dell'aglicone.

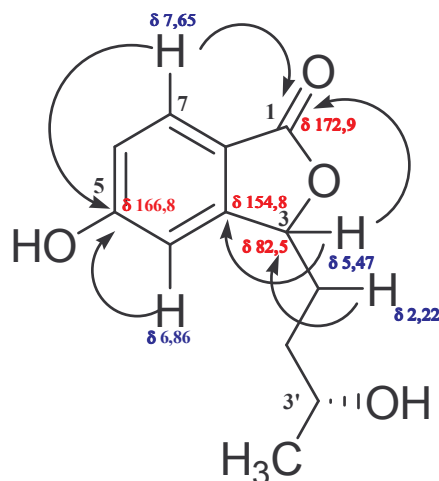
L'altra unità di glucosio è legata al C-13c. La conferma si è avuta anche in questo caso, grazie all'analisi dello spettro HMBC nel quale compare un picco di correlazione J^3 tra l'H-1' del Glu II (δ_{H} 4.73) ed il C-13c (δ_{C} 161.6) dell'aglicone. Così come per il Foeniculoside X l'analisi dell'esperimento ROESY ha indicato come *trans* la configurazione dei protoni H-7a/H-8a e H-7b/H-8b e . *cis*- la geometria del legame H-7c/H-8c.

Sulla base di questi dati il **foeniculoside XI** può essere definito come: **11a, 13c -di-O- β -D- Glucopiranoside del *cis*-miabenolo C.**

Tabella 13. ^1H e ^{13}C NMR (CD_3OD , 500 e 125 MHz) di
Foeniculoside X, Foeniculoside XI e cis-miabeno C

	Foeniculoside X		Foeniculoside XI		cis-miabeno C	
Posizione	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1a	-	135.1	-	135.3	-	135.6
2(6)a	7.08 <i>d</i> (8.5)	127.1	7.07 <i>d</i> (8.5)	127.2	7.05 <i>d</i> (8.5)	127.6
3(5)a	6.82 <i>d</i> (8.5)	116.0	6.80 <i>d</i> (8.5)	116.1	6.77 <i>d</i> (8.5)	116.3
4a	-	158.2	-	158.7	-	158.5
7a	5.21 <i>d</i> (3.0)	93.8	5.25 <i>d</i> (3.0)	93.9	5.23 <i>d</i> (2.6)	94.2
8a	4.11 <i>d</i> (3.0)	57.2	4.10 <i>d</i> (3.0)	57.0	4.15 <i>d</i> (2.6)	57.6
9a	-	148.6	-	148.5	-	144.3
10a	5.90 <i>s</i>	106.8	5.91 <i>s</i>	107.1	5.84 <i>d</i> (2.0)	107.2
11a	-	160.2	-	160.5	-	160.6
12a	6.38 <i>t</i> (2.0)	103.4	6.33 <i>t</i> (2.0)	103.3	6.08 <i>d</i> (2.0)	102.3
13a	-	159.3	-	159.1	-	160.6
14a	5.96 <i>s</i>	109.2	5.92 <i>s</i>	108.8	5.84 <i>d</i> (2.0)	106.9
1b	-	133.9	-	134.1	-	134.1
2(6)b	6.33 <i>d</i> (8.4)	127.2	6.27 <i>d</i> (8.4)	127.2	6.34 <i>d</i> (8.5)	127.3
3(5)b	6.50 <i>d</i> (8.4)	116.0	6.50 <i>d</i> (8.4)	116.0	6.47 <i>d</i> (8.5)	116.0
4b	-	156.8	-	157.5	-	157.8
7b	5.23 <i>d</i> (2.3)	92.8	5.17 <i>d</i> (2.3)	92.7	5.23 <i>d</i> (2.6)	93.0
8b	3.76 <i>d</i> (2.3)	53.0	3.77 <i>d</i> (2.3)	53.0	3.81 <i>d</i> (2.3)	52.8
9b	-	143.7	-	144.4	-	144.4
10b	-	119.8	-	123.0	-	120.2
11b	-	162.1	-	162.4	-	162.6
12b	6.23 <i>d</i> (2.0)	95.0	6.25 <i>s</i>	96.3	6.21 <i>d</i> (1.8)	96.3
13b	-	159.6	-	160.3	-	159.7
14b	6.10 <i>d</i> (2.0)	107.4	6.09 <i>s</i>	108.6	6.08 <i>d</i> (1.8)	107.7
1c	-	125.6	-	127.8	-	128.4
2(6)c	6.61 <i>d</i> (8.6)	131.0	6.59 <i>d</i> (8.6)	131.0	6.63 <i>d</i> (8.5)	131.2
3(5)c	6.44 <i>d</i> (8.6)	115.8	6.44 <i>d</i> (8.6)	115.8	6.43 <i>d</i> (8.5)	115.9
4c	-	157.4	-	158.2	-	158.0
7c	5.66 <i>d</i> (12.2)	131.0	5.68 <i>d</i> (12.2)	131.4	5.72 <i>d</i> (12.0)	131.8
8c	5.81 <i>d</i> (12.2)	126.0	5.80 <i>d</i> (12.2)	125.6	5.81 <i>d</i> (12.0)	126.0
9c	-	137.6	-	137.0	-	138.0
10c	-	121.8	-	122.0	-	119.8
11c	-	160.3	-	161.9	-	162.8
12c	6.24 <i>d</i> (1.8)	95.5	6.58 <i>s</i>	97.3	6.25 <i>d</i> (1.8 Hz)	96.8
13c	-	159.6	-	161.6	-	159.9
14c	6.07 <i>d</i> (1.8)	108.0	6.30 <i>s</i>	108.5	6.05 <i>d</i> (1.8)	107.5
	Glc		Glc			
1	4.70 <i>d</i> (7.6)	101.4	4.71 <i>d</i> (7.8)	101.1		
2	3.46	74.7	3.43	74.6		
3	3.45	76.5	3.49	77.6		
4	3.55 <i>t</i> (8.9)	70.6	3.47	70.8		
5	3.46	77.4	3.31	77.7		
6	3.84 <i>dd</i> (4.3, 11.4)	68.6	3.90	61.9		
	4.06 <i>dd</i> (11.4)		3.77			
	Glc I		Glc II			
1'	4.39 <i>d</i> (7.7)	104.5	4.73 <i>d</i> (7.8)	102.4		
2'	3.25	75.0	3.42	74.6		
3'	3.31	77.5	3.44	77.7		
4'	3.35	71.2	3.48	70.8		
5'	3.25	77.7	3.36	77.4		
6'	3.68 <i>dd</i> (5.9-11.9)	62.4	3.82	61.9		
	3.87 <i>dd</i> (2.3-11.9)		3.75			

**(3'R)-5-idrossi-3-(3' idrossibutil)
isobenzofuran-1-(3H)-one**



Dall'analisi dello spettro ^{13}C -NMR e dai dati dello spettro di massa FABMS ad alta risoluzione nel quale è presente uno ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z 244.9930. (calcd: 245.0790) è stato possibile ipotizzare la formula molecolare $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

Nello spettro protonico sono presenti a campi bassi due doppietti a δ_{H} 7.65 ($J = 8.4$ Hz) e δ_{H} 6.86 ($J = 1.7$ Hz) ed un doppio doppietto a δ_{H} 6.93 ($J = 8.4, 1.7$ Hz) che, dall'analisi della molteplicità e delle costanti di accoppiamento, hanno fatto supporre la presenza di un anello aromatico 1,2,4-trisostituito.

L'analisi dello spettro ^{13}C NMR ha indicato la presenza di 12 carboni, che dallo studio dello spettro di eterocorrelazione diretta HSQC sono risultati essere: un metile, due metileni, cinque metini (di cui tre relativi a carboni aromatici e due a carboni ossigenati), tre carboni quaternari (di cui uno ossigenato risuonante a δ_{C} 166.8 ppm) ed un carbonio carbonilico.

L'analisi dello spettro COSY ha consentito di individuare due sistemi di spin.

Il primo sistema di spin ha interessato il nucleo aromatico in cui solo due protoni (H-6 e H-7) risultano accoppiati tra di loro.

Il secondo sistema di spin è risultato essere relativo ad una catena idrossialchilica. In particolare, i protoni del metile a δ_{H} 1.17 risultavano essere accoppiati con un protone a δ_{H} 3.75. Quest'ultimo, a sua volta risultava essere accoppiato con un metilene i cui protoni risuonavano a δ_{H} 1.57 e δ_{H} 1.47. Questi, in sequenza, accoppiavano con un altro metilene i cui protoni risuonavano a δ_{H} 2.22 e δ_{H} 1.72. Infine, il protone del metilene a δ_{H} 2.22 correlava, sempre nello spettro COSY, con un protone risuonante come multipletto a δ_{H} 5.47 che non risultava essere accoppiato con nessun altro protone indicando quindi che era legato a due carboni quaternari.

Il protone risuonante a δ_H 3.75, risultava essere accoppiato, nello spettro HSQC con un carbonio a δ_C 68.2 ppm. Dall'analisi del valore di chemical shift sia del ^{13}C che del protonico abbiamo dedotto che si trattava di un CH a cui era legato un gruppo ossidrilico. Questi dati hanno fatto supporre la presenza di una catena 2'-idrossibutilica.

L'esperimento HSQC ha consentito di correlare tutti i segnali protonici con i corrispondenti atomi di carbonio.

La presenza dell'OH fenolico è stata dedotta dall'analisi dello spettro ^{13}C NMR. E' infatti presente in tale spettro un segnale a δ_C 166.8 ppm che corrisponde ad un carbonio quaternario. La collocazione di questo raggruppamento è derivata dalle correlazioni J^2 e J^3 individuabili nell'esperimento HMBC. In particolare l'H-4 (δ_H 6.86) presenta una correlazione J^2 con il C-5 ed il C-9; mentre l'H-7 presenta una correlazione J^3 con il C-5.

Sempre nell'esperimento HMBC erano presenti dei picchi di correlazione tra l'H-7 ed il carbonio carbonilico a δ_C 172.9 ppm oltre a quelli con i protoni aromatici. Inoltre anche il protone a δ_H 5.47, che correlava nell'esperimento HSQC con un carbonio a δ_C 82.3 ppm, mostrava un picco di correlazione con il carbonio carbonilico, con il C-4 aromatico e con un carbonio a δ_C 32.1 ppm. Tali dati, hanno fatto supporre la presenza di un anello lattonico legato al sistema aromatico. La conferma della presenza di tale anello lattonico si è avuta anche mediante l'analisi dello spettro IR in cui era presente una banda di assorbimento caratteristica (valore IR = 1670 cm^{-1}).

Rimaneva a questo punto da definire la posizione, sul sistema isobenzofuranonico, in cui era legata la catena idrossialchilica. Anche in questo caso ci siamo avvalsi dello studio dello spettro HMBC. Diagnostiche, infatti, sono state le correlazioni J^2 tra l'H-1' (δ_H 2.22) ed il C-3 (δ_C 82.7 ppm) e J^3 tra l'H-3' (δ_H 1.57) ed il C-3 (δ_C 82.7 ppm).

La configurazione assoluta del gruppo ossidrilico in 3' è stata definita mediante il metodo di Mosher che prevede l'esterificazione del composto in esame con entrambi gli isomeri dell' MTPA e seguente valutazione degli spettri protonici dei due prodotti ottenuti.

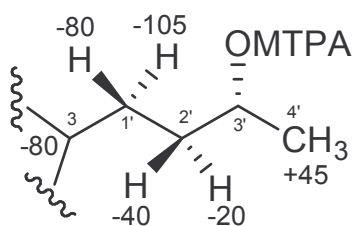


Figura 41. Risultati del metodo di Mosher I valori $\Delta\delta$ sono in Hz ($\delta_S - \delta_R$, 500 MHz).

In base a tali dati il composto è stato definito come: **(3'R)-5-idrossi-3-(3' idrossibutil) isobenzofuran1(3H)-one**.

Tabella 14. 1H e ^{13}C NMR (CD_3OD , 500 e 125 MHz) di
(3'R)-5-idrossi-3-(3' idrossibutil) isobenzofuran1(3H)-one.

(3'R)-5-idrossi-3-(3' idrossibutil) isobenzofuran1(3H)-one		
posizione	δ_H (J in Hz)	δ_C
1	-	172.9
2	-	-
3	5.47 dd (7.5, 3.9)	82.5
4	6.86 d (1.7)	109.3
5	-	166.8
6	6.93 dd (8.4, 1.7)	119.0
7	7.65 d (8.4)	127.9
8	-	116.5
9	-	154.8
1'	2.22 m, 1.72 m	32.1
2'	1.57 m, 1.47 m	35.0
3'	3.75 m	68.2
4'	1.17 d (6.2)	23.5

Attività farmacologica dei metaboliti isolati

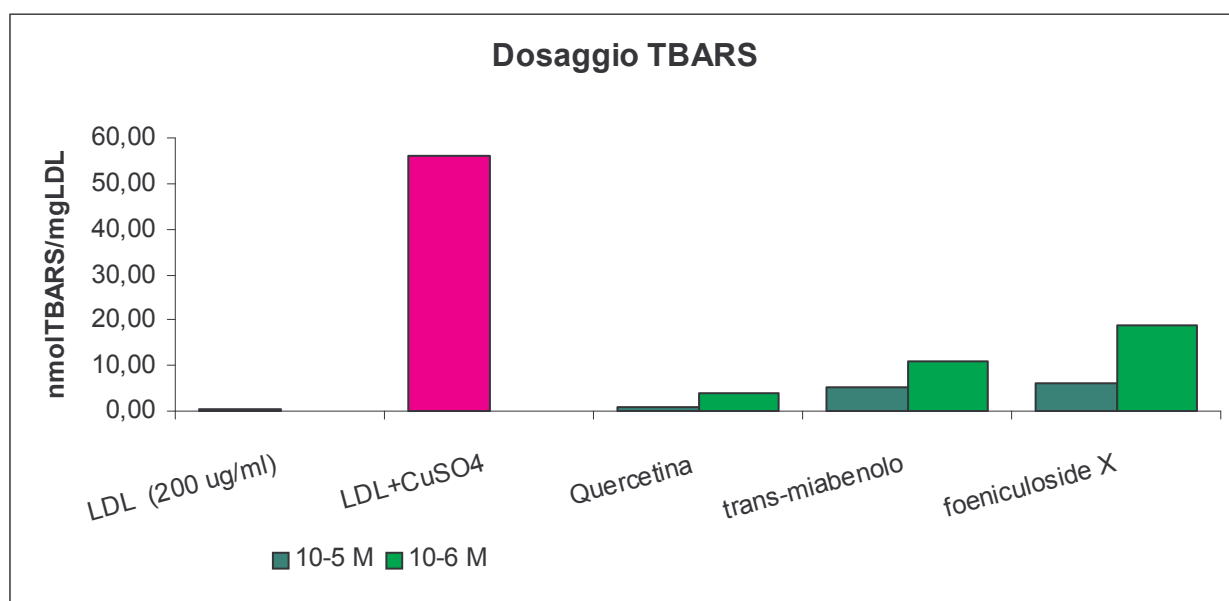
Un'analisi preliminare dell'azione antiossidante dell'estratto butanolic, effettuata presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Milano, aveva mostrato una buona attività a concentrazioni 10^{-5} M, e sicuramente superiore rispetto agli altri estratti.

Successivamente un'analisi simile è stata effettuata per i metaboliti isolati.

I dati per il foeniculoside X sono stati comparati con quelli ottenuti per la quercetina, flavonolo noto per la sua intensa azione antiossidante, e per il *trans*-miabenolo C, analogo strutturale del foeniculoside X.

I dati ricavati utilizzando il test che si basa sulla riduzione del Cu^{++} a Cu^{+} sono risultati poco significativi. Lavorando alla concentrazione di 10^{-6} M, la riduzione del Cu^{++} a Cu^{+} non è sufficiente per dare, mediante la chelazione da parte del cromoforo, un prodotto rilevabile allo spettrofotometro.

Più interessanti sono stati i dati ottenuti lavorando sulle LDL ossidate (TBARS). Il test ha evidenziato per il glicoside fenolico in analisi, una considerevole attività, soprattutto alla concentrazione di 10^{-5} M; non trascurabile neppure quella alla concentrazione di 10^{-6} M. Il processo di ossidazione delle LDL mediata da radicali liberi, porta alla formazione di aldeidi



Schema 7. Dosaggio TBARS

a corta catena. Queste possono essere determinate con il test cumulativo del TBARS (sostanze che reagiscono all'acido tiobarbiturico). Tale denominazione è riportata in letteratura nel caso di impiego di metodi simili al nostro, perché risulta impossibile, in assenza di prove cromatografiche, distinguere le percentuali relative alle varie aldeidi. In questo test dalla reazione di una molecola di aldeide con due di TBA si forma il cromogeno

che viene analizzato allo spettrofotometro a 532 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbono i gruppi SH. Viene utilizzato come controllo positivo e per l'ossidazione dei campioni il CuSO_4 . In questo modo è possibile verificare se il campione studiato è in grado di proteggere le LDL dall'ossidazione a cui sono sottoposte con il CuSO_4 (Schema 7).

Il foeniculose XI, a causa della bassissima quantità raccolta, non è stato sottoposto a nessuno dei due saggi.

Anche per le altre molecole isolate è stata valutata l'attività antiossidante (Tabella 15).

In particolare il 3-(2'-idrossibutil)-5-idrossi-isobenzofuranone ha, mostrato una discreta capacità antiossidante a 10^{-6} M che aumenta notevolmente (6 volte superiore allo standard) a concentrazioni di 10^{-5} M.

Tabella 15. Attività antiossidante di estratti e metaboliti del sangue de drago

Composto	TBARS (nmol TBARS/mg LDL)		Capacità antiossidante (mEq. Acido urico)		DPPH (EC ₅₀)
	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-5} M	
Quercetina	3.85 ± 0.5	0.75 ± 0.04	0.75 ± 0.06	2.17 ± 1.35	4.37×10^{-6} M
BuOH estratto	50.53	7.16	0.045	0.29	4.36×10^{-5} M
Foeniculose X	18.80	6.30	0.021	0.19	3.87×10^{-5} M
cis-miabenolo	70.11	17.52	0.12	0.65	2.56×10^{-5} M
trans-miabenolo	10.79	5.24	0.056	0.51	7.08×10^{-5} M
Estratto acquoso	73.54	13.46	0.039	0.27	1.45×10^{-5} M
Sinapil glucoside	54.59	54.49	0.042	0.27	4.17×10^{-5} M
Siringina	53.95	52.35	0.01	0.05	3.78×10^{-5} M

SANGRE de DRAGO

Sangre de Drago, è il termine comunemente utilizzato per indicare la **linfa resinosa di colore rossastro** che si ottiene per incisione del tronco di *Croton lechleri* un albero molto diffuso nelle regioni amazzoniche di Perù, Ecuador e Colombia.

Descrizione botanica

Croton lechleri appartiene alle *Euphorbiaceae*, una famiglia molto vasta, che comprende soprattutto alberi e arbusti caratterizzati dalla presenza di lattice.

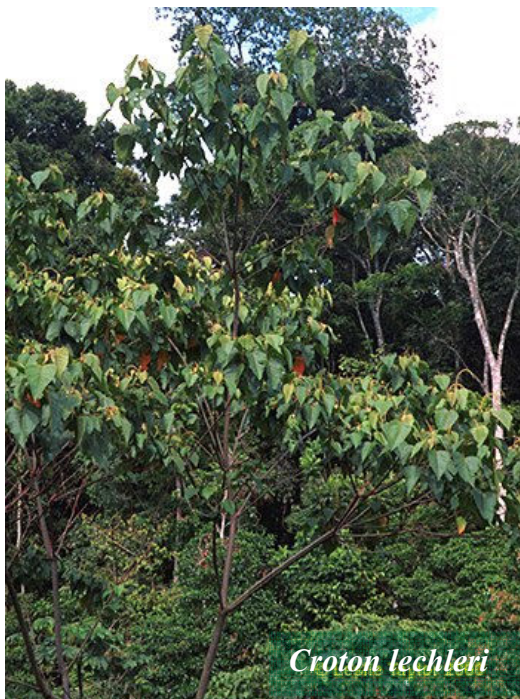


Figura 42. *Croton*

Il genere *Croton* è piuttosto ampio e comprende circa 750 specie di alberi e arbusti distribuiti lungo le regioni tropicali e subtropicali di entrambi gli emisferi.⁸¹

Ha un'altezza compresa tra i 10 e i 20 m ed è costituito da un tronco di 15-25 cm di diametro con una corteccia grigio-biancastra. La chioma è molto ampia ed arrotondata (Fig. 42).

Possiede foglie cuoriformi di 12-20 cm di lunghezza per 5-14 cm di larghezza aventi margine intero e due strutture ghiandolari alla base. Le più giovani sono tomentose da ambo

i lati e di colore rossiccio mentre le più vecchie sono di colore verde brillante con nervature evidenti nella pagina inferiore.

I fiori (fig.43) sono piccoli con stami numerosi, ambrati, formanti inflorescenze racemose in rametti lunghi oltre i 30 cm. Il frutto, invece, è una capsula globulosa, depressa di circa 3 cm di lunghezza per 4.5 cm di larghezza.

Il *sangre de drago* si ottiene soprattutto per incisione del tronco degli alberi di età di 5-6 anni, e la resa così come la composizione varia notevolmente a seconda delle stagioni. In particolare, durante la stagione delle piogge si riescono ad ottenere anche fino a ben sei litri di lattice, dopodiché l'albero muore.



Fig.43. *fiori di Croton*

Attività farmacologica del sangue di drago

La prima testimonianza sull'utilizzo del *sangre de drago* per scopi medici risale al 1600, quando il naturalista ed esploratore spagnolo P. Bernabè Cobo notò che il potere curativo del lattice era conosciuto da tutte le tribù indigene del Messico, Perù ed Ecuador.⁸²

Infatti, per secoli, la resina è stata applicata sulle ferite per fermare emorragie, per accelerare la guarigione, per sigillare e proteggere le ferite dalle infezioni.

Viene considerato da alcuni come **il più potente cicatrizzante naturale** disponibile sul mercato e questo impiego è senza dubbio quello per il quale questo prodotto naturale è famoso in tutta l'Amazzonia. Ciò che caratterizza la cicatrizzazione⁸³ è la velocità attraverso la quale si manifesta: e difatti in diversi esperimenti di laboratorio è stata osservata, dopo un solo giorno di trattamento, la formazione di una crosta dura e spessa.⁸⁴



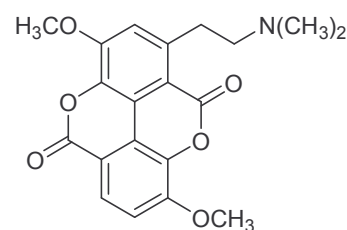
Figura 44. Per gli alchimisti medievali, un dragone spirato poteva essere trasformato in una pietra filosofale; bassorilievo medievale che descrive il misticismo che circonda il sangue di drago.

Un primo studio della resina ha attribuito quest'interessante attività alla presenza delle proantocianidine, la cui complessa struttura determinava la precipitazione delle proteine del siero.

A questa interpretazione però si è poi contrapposta la tesi della scuola americana, secondo cui la principale sostanza responsabile dell'azione cicatrizzante del *sangre de drago* è l'alcaloide taspina.⁸⁵ Sicuramente questo alcaloide è in grado di determinare la chemotassi dei fibroblasti e la loro attivazione. E' probabile che in realtà la rapida e completa azione cicatrizzante del *sangre de drago* sia da imputare ad una sinergia d'azione anche se molto

resta ancora da chiarire: a differenza di tutti gli altri cicatrizzanti, ad esempio, né la taspina né la frazione dei lignani inducono proliferazione dei fibroblasti ma sembrano piuttosto preservare il tessuto originario.⁸⁶

Anche l'**attività antiflogistica**⁸⁷ è stata notevolmente documentata in vari modelli animali, e responsabile sembra essere la taspina. Il lattice diluito ed assunto per via orale riduce l'espressione genica di fattori che scatenano la risposta infiammatoria (TNF, iNOS, COX-2, IL-6 e IL-1). Da uno studio condotto da Miller *et al.* nel 2001 si ipotizza che questa azione antinfiammatoria derivi dall'inibizione dei nervi sensoriali afferenti presenti a livello cutaneo, polmonare ed intestinale.⁸⁸ L'applicazione topica, in vivo, sembra in grado di ridurre in maniera significativa l'edema e l'iperalgisia⁸⁹ dove il componente attivo sembrano essere delle proantocianidine oligomeriche. Inoltre studi recenti hanno evidenziato il loro coinvolgimento anche in un'azione condroprotettiva.⁹⁰



Taspina

L'**attività antibatterica**⁹¹ sembra, invece, essere imputabile ad alcune sostanze polifenoliche (2,4,6-trimetossifenolo e 1,3,5-trimetossibenzene) ed a alcuni diterpenoidi⁹² che sono in grado di inibire la crescita batterica ed in particolare quella di *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Stupefacente poi è l'**attività antivirale**⁹³ il lattice, infatti, in vitro inibisce il virus dell'Herpes simplex (HSV-1 e HSV-2), dell'influenza di tipo A, oltre che dei virus parainfluenzali, del citomegalovirus, del virus respiratorio sinciziale.

Altri studi hanno, invece, valutato l'**attività antiulcera**⁹⁴ del sangue de drago. Le ulcere trattate risultavano più piccole, meno infiammate e con minor colonizzazione batterica rispetto a quelle non trattate. Una diluizione 1:10 di Sangue di Drago risultava fortemente efficace, mentre la diluizione 1:100 perdeva decisamente le sue proprietà.

Il lattice ha mostrato, inoltre, anche un **attività immunomodulante**⁹⁵ causa la sua capacità di inibire, in vitro, il sistema del complemento e delle cellule T e ad un'attività scavenging nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte da neutrofili e monociti, probabilmente legata alla presenza di proantocianidine.

Studi su linee cellulari KB hanno evidenziato anche una potenziale **attività antitumorale**.⁹⁶

Infine, una potente attività **antiossidante**⁹⁷ legata alla presenza di elevate quantità di polifenoli è stata dimostrata da numerosi studi *in vitro*.

Tutta questa complessità d'azione del sangue di drago sembra essere riconducibile essenzialmente ad un effetto sinergico tra le diverse componenti.

Sp-303

Tra tutte le molecole isolate dal sangue de drago nel corso degli studi effettuati negli ultimi decenni quella oggetto dei più forti interessi scientifici e commerciali è stata la proantocianidina oligomerica **SP-303**.

I primi studi farmacologici effettuati a cavallo tra gli anni '80 e '90 avevano evidenziato come applicazioni topiche risultavano significativamente efficaci nel trattare le lesioni da *Herpes virus* delle labbra, anche se resistenti all'acyclovir⁹⁸ e dell' *Herpes genitalis* nei soggetti affetti da AIDS.⁹⁹

I fortissimi interessi dell' azienda farmaceutica americana *Shaman Pharmaceutical* si concentrarono a metà degli anni '90 sull'SP-303 soprattutto però sulla capacità di tale composto di ridurre il numero e l'intensità delle scariche diarroiche in soggetti con AIDS affetti da diarrea di origine virale. Il farmaco inibiva, infatti la secrezione di cloro a livello intestinale, legata ad un elevata concentrazione di AMPc.¹⁰⁰ La diarrea cronica è una sindrome devastante che colpisce più della metà dei soggetti malati di AIDS, compromettendo drammaticamente il loro stato di salute. La presenza fino ad allora solo di rimedi sintomatici con scarsa efficacia spinse l'azienda ad investire milioni di dollari su questo prodotto di origine naturale.

La molecola fu brevettata col nome ProvirTM ed i primi risultati di uno studio clinico di fase II ¹⁰¹ resi noti nell'ottobre del 1997 suscitarono grande interesse da parte di tutta la comunità scientifica. Quattro giorni di trattamento per via orale, determinavano un forte miglioramento sia in termini frequenza di svuotamento intestinale, che in termini di caratteristiche delle feci. Il 21 dicembre del 1998 furono, poi presentati i risultati di un successivo studio di fase III su 400 pazienti, randomizzato e controllato verso placebo. Altri studi clinici hanno, invece, riguardato il possibile utilizzo del farmaco nel trattamento sintomatico della 'diarrea del viaggiatore'.¹⁰²

La richiesta da parte dell'FDA di ulteriori studi clinici, e soprattutto i sempre più frequenti scontri tra l'azienda farmaceutica e le comunità amazzoniche per la fornitura di sangue de drago (da cui si estraeva il farmaco) determinarono poi l'abbandono degli studi sull'SP-303.

Estrazione ed isolamento

Oggetto della mia attività di ricerca è stato il *sangre de drago* raccolto nella foresta amazzonica peruviana per incisione del tronco di *Chroton lechleri* (Fig. 45).

200 mL. della resina sono stati sciolti in MeOH-H₂O (9:1, v/v) ed estratti con *n*-esano, e successivamente, dopo aver modificato il rapporto in MeOH-H₂O (6:4, v/v) estratti con CHCl₃.

La fase acquosa è stata concentrata per eliminare metanolo ed è stata estratta con *n*-BuOH.

L'estratto butanolico è stato purificato mediante Sephadex LH-20 usando come eluente metanolo e la prima frazione ottenuta, ulteriormente purificata mediante cromatografia contro corrente a goccia DCCC utilizzando in modo discendente, un sistema ternario a due fasi costituito da *n*-BuOH-Me₂CO-H₂O (3:1:5).

Le frazioni raccolte sono state raggruppate in base al comune comportamento cromatografico su TLC e poi sottoposte a HPLC su colonna C₁₈ μ -Bondapak (30 cm x 3.9 mm i.d) con MeOH-H₂O (15:85) ottenendo **epigallocatechina** (**9**; 5.2 mg), **gallocatechina** (**10**; 11,8 mg) ed **epicatechina** (**7**; 6.8 mg).

Successivamente è stato preso in analisi l'estratto cloroformico. Inizialmente è stato purificato mediante cromatografia contro corrente a goccia (DCCC), utilizzando in modo discendente, un sistema ternario a due fasi costituito da CHCl₃-MeOH-H₂O (7:13:8). Le frazioni ottenute sono state raggruppate in base al comune comportamento cromatografico su TLC, utilizzando come miscela eluente CHCl₃/MeOH/H₂O (80:18:2).

Le frazioni ottenute sono state ulteriormente purificate mediante colonna analitica C₁₈ μ -Bondapak permettendo l'isolamento di **glucoside dell'acido fluoribundico** (**14**; 1.2 mg), **blumenolo B** (**1**; 2.2 mg), **blumenolo C** (**2**; 8.6 mg), **diidroblumenolo A** (**3**; 9.5 mg), **3',4-O-dimetilcedrusina** (**4**; 3.9 mg), il **1-(4-idrossi-3-metossifenil)-2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossil]-propan-1,3-diolo** (**5**; 1.3 mg); **2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossil]-propan-1,3-diolo** (**6**; 1.6 mg), **3 (3,4,5 trimetossifenil)prop-2-en-1-olo** (**11**; 2.8 mg), **3 (3,4 dimetossifenil)propan-1-olo** (**12**; 0.8 mg), **3 (3,4,5 trimetossifenil)propan-1-olo** (**13**; 1.7 mg), epicatechina e catechina (**8**; 4 mg).

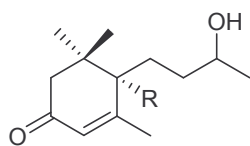
Ultimo obiettivo è stato poi l'isolamento degli alcaloidi. 50 ml di *sangre de drago* sono stati liofilizzati, fino ad ottenere una polvere finissima rossa. Dopo solubilizzazione in H₂O il



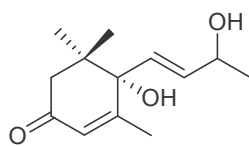
Fig.45. Incisione del tronco di croton

tutto è stato acidificato fino a pH 1.5 e poi estratto in continuo con egual quantità di CHCl_3 per 3 volte. Dopo allontanamento della fase organica, quella acquosa è stata poi alcalinizzata con NH_4OH fino a pH 8 e riestratta con CHCl_3 per 3 volte. Dopo allontanamento della fase organica la frazione basica a pH 8 è stata solubilizzata in MeOH, riscaldata e lasciata raffreddare ottenendo un residuo solido bianco riconosciuto come **taspina** (15 11.3 mg).

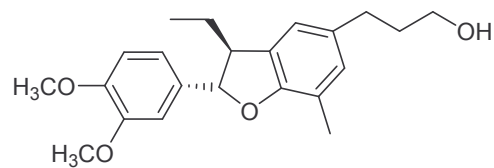
La caratterizzazione strutturale di tutti i quindici metabolici secondari isolati dal *sangre de drago* è stata effettuata mediante l'analisi combinata degli spettri di massa ESI-MS e di tecniche di risonanza magnetica nucleare mono- e bi- dimensionali.



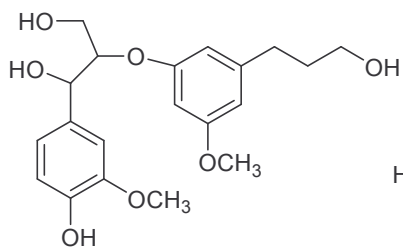
1 R=OH Blumenolo B
2 R=H Blumenolo C



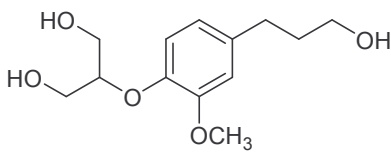
3



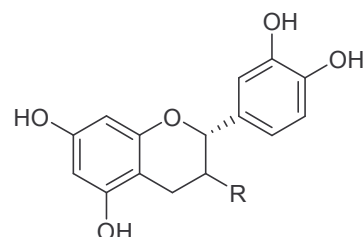
4



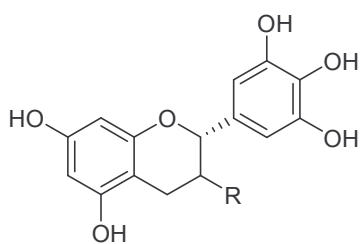
5



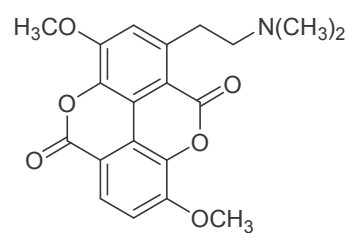
6



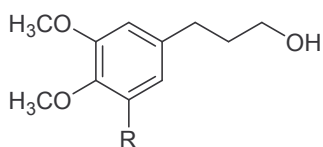
7 R=OH Epicatechina
8 R=H Catechina



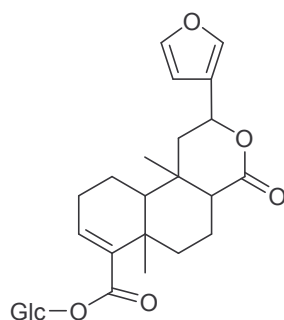
9 R=OH Epigallocatechina
10 R=H Gallocatechina



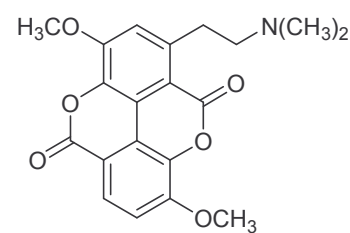
11



12 R=H
13 R=OCH₃



14



15

Fig.46. Strutture di tutte le molecole isolate

Analisi dei metaboliti isolati

L'analisi del sangue de drago negli ultimi decenni aveva già evidenziato una notevole varietà di metaboliti secondari con strutture molto diverse tra loro ed anche in questo studio le molecole isolate hanno caratteristiche chimiche molto differenti tra loro.

Mentre la presenza nella resina rossa di catechina, epicatechina e galocatechina,¹⁰³ così come quella della taspina era già ben nota da tempo è molto importante evidenziare che **dei 15 prodotti isolati alcuni di essi non siano mai stati recuperati, da una pianta appartenente al genere *Croton*.**

È il caso dei megastigmani diidroblumenolo A (3), blumenolo B (1), e blumenolo C (2) già isolati in numerose occasioni da piante appartenenti alla famiglia delle Euforbiacee ma, ora, per la prima volta dal genere *Croton*. Il blumenolo B è stato, infatti precedentemente isolato dal genere *Phyllanthus*,¹⁰⁴ il blumenolo C da *Glochidion zeylamicum*,¹⁰⁵ mentre il diidroblumenolo A da *Perrottetia multiflora*¹⁰⁶ e da *Laurus nobilis*.¹⁰⁷ Sulla base di questi dati, quindi i tre megastigmani sembrano essere caratteristici oltre che dei generi *Antidesma*, *Glochidion*, *Phyllanthus* anche del genere *Croton*.

Per quanto riguarda la classe dei lignani, invece, molti studi testimoniano la loro cospicua presenza in resine ottenute da piante del genere *Croton* ma mai sono stati isolati il 3',4-O-dimetilcedrusina,(4)¹⁰⁸ il raro 1-(4-idrossi-3-metossifenil)-2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossil]-propan-1,3-diolo(5) (conosciuto anche come 7',8'-diidroguaiacil glicerol-β-coniferil etere, ed isolato unicamente dal *Pinus silvestris*)¹⁰⁹ e 2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossil]-propan-1,3-diolo (6) (isolato dagli acini di *Vitis vinifera*).¹¹⁰

Altro caso è quello dell' l'acido fluoribundico glucoside (14) appartenente alla famiglia dei clerodani. Studi fitochimici¹¹¹ hanno già testimoniato la presenza in piante del genere *Croton* di molecole appartenenti alla famiglia dei clerodani, ma mai del composto isolato in questo studio. Finora , infatti, il composto 14 era stato isolato unicamente dalla pianta tropicale medicinale *Peniathus zenkeri*¹¹² appartenete alla famiglia delle Menispermacee.

Clerodani:

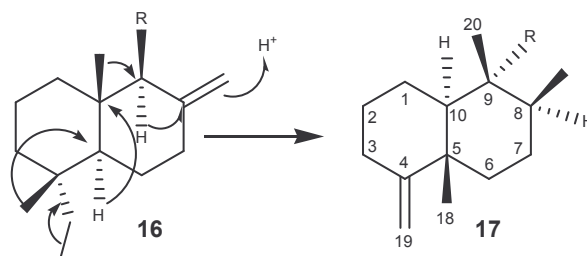
I diterpeni sono un gruppo di molecole costituite da 20 atomi di carbonio e derivano tutti dal *2E,6E,10E* geranilgeranil pirofostato (GGPP) in seguito ad una serie di biotrasformazioni. Le strutture sono altamente variabili e sono classificate in base alla loro origine biogenetica. in diterpeni aciclici e ciclici. I diterpenoidi aciclici sono lineari e possono avere cicli o unità lattoniche, mentre quelli ciclici sono classificati in base al numero di anelli contenuti nella struttura. A loro volta diterpeni ciclici possono essere classificati in

due distinti gruppi di enantiomeri conosciuti come la serie *normale* e la serie *ent*, con configurazione opposta in C-5, C-9 e C-10.

La ciclizzazione del GGPP avviene mediante due meccanismi diversi, ed in entrambi i casi la formazione del carbocatione consente facilmente la formazione dell'anello.

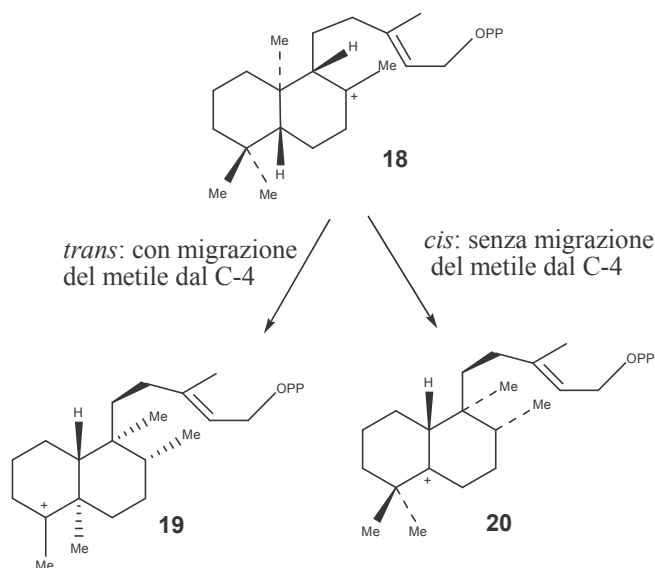
Il numero degli anelli formati dalla ciclizzazione può variare e questo porta ad una diversificazione strutturale. I diterpeni possono, per esempio, essere biciclici come il labdadiene (**16**), attraverso la condensazione di due anelli a sei atomi di carbonio legati tramite il C-5 ed il C-10.

Il clerodano (**17**) e il *neo*-clerodano (*ent*-clerodano) derivano dal labdadiene (**16**) in seguito ad un riarrangiamento che comporta la migrazione di idrogeni e gruppi metilici (Schema 8).



Schema 8. clerodani

I gruppi in C-8 e in C-9 possono essere *cis* o *trans* (Schema 9). Questi composti sono particolarmente abbondanti nella specie del *Teucrium* appartenente alla famiglia delle Lamiaceae, e possono essere funzionalizzati e ossigenati.



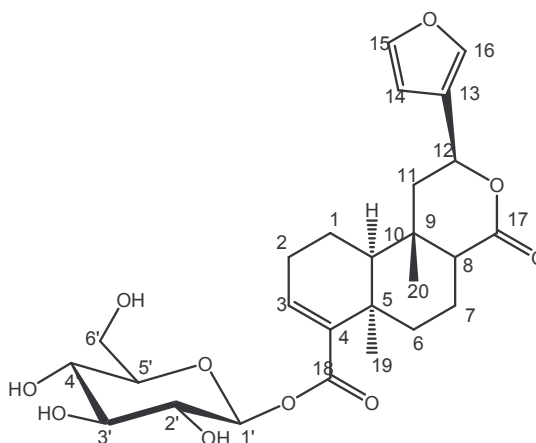
Schema 9. clerodani

I metaboliti con il nucleo del clerodano possono essere distinti in composti *cis* e *trans*, a seconda della stereochimica della giunzione dei due anelli della *decalina*.

Dal punto di vista biosintetico, sembra che i clerodani siano correlati ai labdani, attraverso una serie di migrazioni di metili e idrogeni. I composti *cis* (**19**) e *trans* (**20**), si originano dal labdano (**18**) in base alla migrazione del gruppo metilico in C-4.¹¹³

Di seguito, a titolo esemplificativo, è descritta la caratterizzazione strutturale di tre dei quindici differenti metaboliti secondari isolati dal *sangre de drago*.

Glucoside dell' Acido floribundico



L'acido floribundico è costituito da una unità diterpenica legata ad un furano che dà origine allo scheletro del clerodano. Lo spettro di massa ESI-MS ha mostrato uno ione molecolare a m/z 506 ed un frammento a m/z 344 dovuto alla perdita di 162 u.m.a.

Lo spettro ^1H NMR ha evidenziato, invece, un ampio range di segnali che si disperdono da 8 ppm fino a 1 ppm. I segnali ben risolti da 8 a circa 3 ppm, risultavano particolarmente affollati a campi alti. Risaltavano, però, due segnali inerenti a gruppi metilici a δ_{H} 1.12 e δ_{H} 1.36 ciascuno con la molteplicità di singoletto (Tabella 16).

Attraverso l'analisi degli spettri COSY, HSQC ed HMBC è stato possibile definire lo scheletro diterpenoico, l'unità di furano e il monosaccaride presente.

Lo spettro ^{13}C NMR mostrava 26 carboni di cui 2 funzioni carbossiliche a δ_{C} 166.2 e δ_{C} 175.3 ppm.

Per quanto attiene l'unità diterpenoidica, dal COSY è stato possibile evidenziare 3 sistemi di spin: dagli H_2 -1 all' H -3, dagli H_2 -6 all' H -8 e dagli H_2 -11 all' H -12. La correlazione era interrotta al protone olefinico H -3 (δ_{H} 6.87), per poi proseguire, data la presenza di due carboni quaternari in C-4 e C-5, con gli H_2 -6 che risuonavano a δ_{H} 1.26 e δ_{H} 2.62 ciascuno come doppio doppietto. Questo secondo sistema di spin, mostrava interrompersi all' H -8 (δ_{H} 2.40). Il terzo sistema di spin, infine, comprendeva gli H_2 -11 accoppiati unicamente con l' H -12 (δ_{H} 5.62).

Attraverso l'esperimento HSQC è stato poi possibile correlare i protoni della molecola con i corrispondenti atomi di carbonio.

La successiva connessione dei frammenti individuati dal COSY è stata, invece, realizzata attraverso l'esperimento HMBC che consente di visualizzare le correlazioni C-H attraverso due e tre legami (J^2 , J^3).

Primo passo è stato la definizione della posizione dei due metili singoletto a δ_H 1.36 e δ_H 1.12 che risultavano legati rispettivamente al C-5 ed al C-9.

La funzione carbonilica a δ_C 166.2 ppm (C-18) risultava legata al C-4 in quanto si osservava la correlazione tra l'H-3 ed il C-18 (J^3) e tra l'H-3 ed il C-4 (J^2). Il C-4, ibridato sp^2 , evidenziava a sua volta una correlazione con l'H-6 (δ_H 1.26). I cross-peaks, H-6/C-19 e H-10/C-19 confermavano, infine il legame del CH_3 -19 (δ_H 1.36) sul C-5.

Il protone in posizione 8 è risultato cruciale per la collocazione della seconda funzione carbonilica (δ_C 175.2) coinvolta in un anello lattonico. Si sono osservati, infatti, le correlazioni tra l'H-8 (δ_C 2.40) e il C-17 (δ_C 175.3 ppm), H-8/C-20 (δ_C 14.6 ppm) e H-8/C-10 (δ_C 53.6 ppm). La chiusura dell'anello lattonico è stata poi confermata dalla J^3 tra H-12 (δ_H 5.62) ed il C-17 (δ_C 175.3).

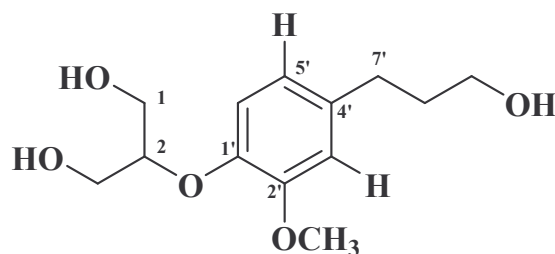
L'anello furanico è stato individuato dal COSY attraverso la sequenza H-14/H-15, mentre l'H-16 a δ_H 7.60 appariva come un protone isolato. Il sito di connessione con lo scheletro diterpenico è stato definito, anche in questo caso, attraverso l'esperimento HMBC in quanto si osservano le correlazioni J^3 H-14/C-12 e H-16/C-12 e la J^2 H-12/C-13.

La presenza dell'unità di glucosio è stata dedotta dall'analisi degli esperimenti NMR bidimensionali (COSY, HSQC e HMBC). La conferma si è avuta in seguito ad analisi gas cromatografica. Infatti la molecola è stata sottoposta a metanolisi acida ed i metil glucosidi ottenuti, dopo sililazione, sono stati analizzati mediante GC adoperando degli standard di riferimento. Da tale analisi è risultata la presenza di una unità di glucosio.

L'idrogeno anomerico del glucosio risuonava nello spettro 1H NMR a δ_H 5.52 e dalla J (δ_H 8.1) si deduceva che il monosaccaride era nella forma β -piranosica, confermata poi dai dati del ^{13}C NMR. Lo shift del carbonio anomerico a campi alti (δ_C 95.4 ppm), in accordo con una struttura acilglucosidica, mostrava come il glucosio fosse legato al nucleo diterpenico, attraverso un gruppo estereo. Ciò è stato anche confermato dallo spettro HMBC in cui si osservava la correlazione J^3 H-1' (δ_H 5.52)/C-18 (δ_C 166.2 ppm).

La configurazione relativa dei centri chirali C-5, C-10, C-9 e C-12 è stata definita attraverso un esperimento ROESY. Si osservava infatti un intenso ROE tra il CH_3 -19, H-8 e H-10 che individuavano una giunzione *cis* tra gli anelli A e B come in altri clerodani riportati in letteratura. Un altro ROE era evidente tra l'H-8 e H-12 e tra il CH_3 -20 e H-11 β . Da ciò si è dedotto che il CH_3 -20 e il legame in C-12 con il nucleo del furano dovevano essere collocati sulla faccia β del sistema triciclico.

**2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossi]-
propan-1,3-diolo**



L'analisi dello spettro ESI-MS ha evidenziato la presenza dello ione pseudomolecolare a m/z 257.0.

Dallo spettro protonico si sono evidenziati una serie di segnali ben definiti in un range tra δ_H 1.70 e δ_H 7.0 ppm.; a campi bassi si osservavano tre segnali imputabili a idrogeni collocati su un sistema aromatico a δ_H 6.99, δ_H 6.86, δ_H 6.74 (Tabella 17).

Nella zona compresa fra 4.5 e 3.0 ppm, quella in cui risuonano normalmente gli idrogeni legati ad atomi di carbonio ossidrilati, ben evidenti risultavano quattro segnali di cui, uno a δ_H 3.84 che risuonava come singoletto e assegnabile ad un raggruppamento $-OCH_3$ collocato su un sistema aromatico. Tenendo conto di altri due segnali a campi alti (δ_H 2.62 e δ_H 1.82) è stato possibile ipotizzare la presenza di un sistema aromatico legato ad una catena alchilica e con vari gruppi ossigenati.

L'analisi dello spettro ^{13}C ha consentito di individuare tredici atomi di carbonio; di cui sei assegnabili ad un sistema aromatico, quattro relativi a C che portano funzioni ossidriliche, un carbonio inerente ad un gruppo $-OCH_3$, ed una catena a due atomi di carbonio.

Attraverso l'esperimento HSQC di eterocorrelazione diretta C-H è stato possibile correlare ciascuna risonanza protonica ai carboni cui sono legati.

Dall'analisi dello spettro COSY si è osservato che il protone aromatico a δ_H 6.99 ($J=8.1$ Hz), che risuonava come doppietto nello spettro 1H NMR, risultava accoppiato esclusivamente con il protone a δ_H 6.74. Quest'ultimo che nello spettro protonico risuonava come doppio doppietto, risultava essere accoppiato oltre che con il segnale a δ_H 6.99 anche con un altro protone aromatico a δ_H 6.86 ($J=1.5$ Hz). Ciò indicava la presenza di un sistema aromatico trisostituito, in cui era presente anche una funzione $-OCH_3$ come risultava sia dallo spettro protonico (δ_H 3.84, s) che dallo spettro ^{13}C NMR (δ_C 56.1 ppm).

Definita così la presenza di tre protoni ed un metossile sull'anello aromatico, passo successivo è stata la definizione della funzionalizzazione degli altri due carboni aromatici.

Il quintupletto a δ_H 4.15 ben evidente nello spettro 1H NMR risultava correlato, nello spettro COSY unicamente con un segnale a δ_H 3.75.

Quest'ultimo, presentando un'intensità del segnale doppia rispetto a quella di un unico CH_2 , lasciava presupporre che tale segnale fosse inerente a due funzioni $-CH_2OH$ tra loro equivalenti e quindi entrambe legate ad un CH. Ciò ha fatto supporre la presenza di un residuo di glicerolo.

Dallo spettro COSY, è stato possibile individuare un terzo sistema di spin, costituito da una catena alchilica che termina con un alcool primario. Infatti, nello spettro COSY i protoni a δ_H 2.62 sono accoppiati con i protoni del CH_2 a δ_H 1.82 che, a loro volta, risultano accoppiati con un protone, risuonante come tripletto, a δ_H 3.56; dal chemical shift nel protonico e dal corrispondente valore del ^{13}C (δ_C 61.9 ppm) è stato possibile individuare la funzione alcolica primaria e quindi caratterizzare la catena di propanolo.

Per definire il rapporto reciproco tra i sostituenti individuati è stato realizzato un esperimento di eterocorrelazione C-H attraverso più legami (HMBC). È stato possibile così definire come *-orto* la posizione della catena alchilica rispetto agli idrogeni aromatici che risuonano a δ_H 6.74 e δ_H 6.86. Entrambi, infatti, mostravano una correlazione J^3 con il C-7' (δ_C 32.4 ppm) (Figura 47).

Il gruppo metossilico a sua volta era in orto rispetto all'idrogeno aromatico che risuona a δ_H 6.86 in quanto ben evidente era la correlazione J^3 tra il protone a δ_H 6.86 ed il carbonio a δ_C 56.1 ppm relativo al gruppo $-OCH_3$.

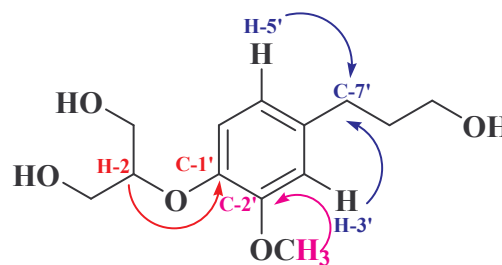
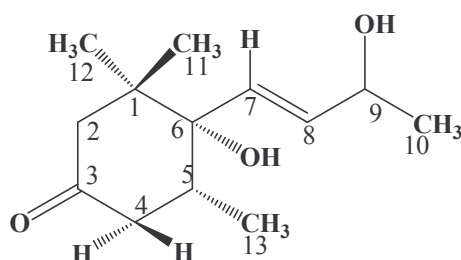


Fig.47. Correlazioni HMBC

Il restante sistema di spin, costituito da un residuo di glicerolo, doveva essere posizionato sul C-1' in quanto si osservavano delle correlazioni J^3 tra il CH a δ_H 4.15 e il C-1' del sistema aromatico a δ_C 146.5 ppm. Un ulteriore supporto all'ipotesi formulata è derivata dall'esperimento NOESY che ha consentito di individuare protoni spazialmente vicini in una molecola. Particolarmente significativo è risultato il NOE fra l' $H-6'$ (δ_H 6.99) con l' $H-2$ (δ_H 4.15) e l' $H-1$ (δ_H 3.75).

Dall'analisi di tutti i dati è stato possibile definire la struttura del composto analizzato come: **2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossi]-propan-1,3-diolo**.

Diidroblumenolo A

Lo spettro ESI-MS ha evidenziato la presenza uno ione molecolare a $m/z = 226$ $[M+H]^+$.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ si sono evidenziati due metili singoletto a δ_{H} 0.92 e a δ_{H} 0.96, due metili doppietto che risuonano a δ_{H} 0.94 e δ_{H} 1.28, un quintupletto a δ_{H} 4.34 e due segnali δ_{H} 5.67 e δ_{H} 5.85, assegnabili a due protoni legati a due carboni ibridati sp^2 (Tabella 17).

L'esperimento $^{13}\text{C-NMR}$ ha evidenziato la presenza di tredici carboni di cui due legati a funzioni ossidriliche, rispettivamente a δ_{C} 68.0 ppm (C-9) e δ_{C} 76.7 ppm (C-6) e soprattutto di una funzione chetonica, δ_{C} 213.9 ppm (C-3).

Lo spettro COSY ha permesso di definire sistemi di spin. Il primo sistema di spin può essere individuato partendo dalla risonanza del metile doppietto a δ_{C} 1.28. accoppiato al protone a δ_{H} 4.34 (C legato ad un ossidrile) a sua volta accoppiato con un doppio doppietto a δ_{H} 5.85 che a sua volta è accoppiato con un doppietto a δ_{H} 5.67. Questi ultimi due segnali sono relativi a protoni di carboni sp^2 e di conseguenza indicano la presenza di un doppio legame disostituito. La geometria del doppio legame è di tipo *trans* come si può dedurre dalla costante di accoppiamento di 15.8 Hz,. La presenza di un carbonio quaternario (C-6) interrompe la prima sequenza di spin.

Un secondo sistema di spin si può individuare partendo dalla risonanza del metile a δ_{H} 0.94 (d) accoppiato con un protone a δ_{H} 2.30 (m), a sua volta, presenta nel COSY una correlazione con due protoni a δ_{H} 2.12 (dd) e δ_{H} 2.46 (t). Il valore di chemical shift di questi due idrogeni geminali ($-\text{CH}_2$), fortemente spostati a campi alti, lasciano presupporre la vicinanza di una funzione carbonilica già individuata in precedenza nel $^{13}\text{C-NMR}$. L'ultimo sistema di spin è un sistema isolato, in quanto è costituito esclusivamente dall'accoppiamento di due H geminali che risuonano rispettivamente a δ_{H} 1.82 (dd) e a δ_{H} 2.89 (d). Anche in questo caso, il chemical shift di uno dei due protoni lascia intuire la vicinanza con un sistema carbonilico.

Questi dati ci consentono di ipotizzare una struttura ciclica con sistemi di sostituzione individuati nello scheletro del megastigmano in cui la funzione chetonica viene collocata in

posizione 3 e la catena alchilica in C-6. Inoltre, il C-6, che dal ^{13}C -NMR risulta essere un carbonio quaternario (δ_{C} 76.7 ppm), deve portare una ulteriore funzione –OH.

L'ipotesi strutturale è stata ulteriormente supportata dall'esperimento HMBC. Significativo ai fini della caratterizzazione strutturale sono stati le correlazione J^3 tra l'H-7 e il C-9, C-1, C-5 e la correlazione J^2 con il C-6. Il protone in C-4 (δ_{H} 2.46) mostrava, inoltre, correlazioni J^3 con C-6, C-2 e C-13, mentre le correlazioni J^2 si osservavano con il C-3 e C-5. Tutto ciò consentiva di assemblare il sistema ciclico e la catena laterale.

La stereochimica nel centro chirale in C-5 è stata determinata sulla base dei risultati di un esperimento NOESY che ha consentito di individuare le correlazioni dipolari tra due gruppi spazialmente vicini. Una intensa correlazione dipolare è stata osservata tra H-5 e H-7 e tra H-5 e CH₃-11. In particolare, questa ultima correlazione rivela che H-5 β e CH₃-11 si trovano sulla faccia β della molecola e da ciò si deduce che il CH₃-13 e il CH₃-12 hanno una orientazione di tipo α .

L'orientazione α del gruppo –OH al C-6 è stata dedotta, invece, tenendo conto del chemical shift del protone assiale in posizione 2 (δ_{H} 2.89 d) e del protone assiale in posizione 4 (δ_{H} 2.46 t). Entrambi gli idrogeni, a causa della interazione spaziale con la funzione OH, risultavano spostati a campi bassi per una interazione 1,3-sin-diassiale con il gruppo ossidrilico in C-6. Di conseguenza, al carbonio chirale in C-6 deve essere assegnata una configurazione di tipo *S*.

Per quanto attiene al centro chirale in posizione 9 non è possibile assegnare la configurazione assoluta attraverso le tecniche spettroscopiche convenzionali e può essere definita esclusivamente utilizzando degli ausiliari chirali ma l'esigua quantità del prodotto isolato non ha permesso tale tipo di studio.

Il composto quindi viene definito come: **(6*R*, 5*S*, 9 ϵ 7*E*)- 3 cheto, 7-en, megastigman-9,6-diolo.**

Tabella 16. ^1H e ^{13}C NMR (CD_3OD , 500 e 125 MHz)
dell'acido fluoribundico glucoside

Glucoside dell'acido fluoribundico

Pos.	δ_{H}	δ_{C}	Pos.	δ_{H}	δ_{C}
1	1.66, 1.80	18.3	Glc		
2	2.29, 2.41	28.0	1'	5.52 d (8.1 Hz)	95.4
3	6.87 t (3.0)	141.0	2'	3.36	73.9
4	-	141.7	3'	3.44	78.2
5	-	38.1	4'	3.37	71.1
6	1.26, 2.62 dt	35.7	5'	3.37	78.8
7	1.68, 2.01	19.5	6'a	3.70 dd (4.4, 11.9),	62.3
8	2.40	52.0	6'b	3.84 dd (1.7, 11.9)	
9	-	38.1			
10	1.38	53.6			
11	1.76, 2.44 dd (5.9, 13.5)	44.6			
12	5.62 dd (5.9, 11.4)	73.8			
13	-	127.5			
14	6.56 s	109.8			
15	7.51 t (1.5)	145.0			
16	7.60 s	141.2			
17	-	175.3			
18	-	166.2			
19	1.36 s	21.4			
20	1.12 s	14.6			

Tabella 17. ^1H e ^{13}C NMR del 2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossi]-propan-1,3-diolo

(a sx) e del diidroblumenolo A (a dx)

2-[4-(3-idrossipropil)-2-metossifenossi]-propan-1,3-diolo		
Pos.	δ_{H}	δ_{C}
1	3.75 d (5.1)	61.7
2	4.15 q	83.0
3	3.75 d (5.1)	61.7
1'	-	146.5
2'	-	151.6
3'	6.86 d (1.5)	113.8
4'	-	138.1
5'	6.74 dd (1.5, 8.1)	121.6
6'	6.99 d (8.1)	119.2
7'	2.62 t (8.1)	32.4
8'	1.82 m	35.3
9'	3.56 t (6.6)	61.9
-OCH ₃	3.84 s	56.1

Diidroblumenolo A		
Pos.	δ_{H}	δ_{C}
1	-	42.9
2a	2.89 d (13.4)	51.4
2b	1.82 d (13.4)	
3	-	213.9
4a	2.46 t (13.4)	45.2
4b	2.12 dd (13.4, 2.1)	
5	2.30 m	37.1
6	-	76.7
7	5.67 d (15.8)	135.6
8	5.85 dd (15.8, 5.9)	131.1
9	4.34 m	68.0
10	1.28 d (6.4)	23.0
11	0.92 s	23.7
12	0.96 s	23.8
13	0.94 d (6.6)	15.2

Attività farmacologica

Gli estratti sono stati analizzati presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli studi di Milano al fine di valutarne l'attività antiossidante. Il contenuto polifenolico più alto è stato quello dell'estratto butanologico con un valore di 306.01 mg/g, rispetto ai 41.87 mg/g della fase cloroformica e 34.37 mg/g della fase acquosa. Logicamente pressochè priva di polifenoli è risultata essere la fase esanica (4.84 mg/g).

La fase butanologica è anche quella che ha dato i migliori risultati nel '*DPPH scavenging test*' (Fig. 48) mostrando un'importante attività antiossidante (misurata come perossidazione lipidica) a valori di 10^{-8} M, contro i 10^{-5} M della fase acquosa ed i 0.09 M della fase cloroformica. Tali risultati sono sicuramente ascrivibili all'enorme quantità di polifenoli, e soprattutto flavan-3-oli presenti nella fase acquosa.

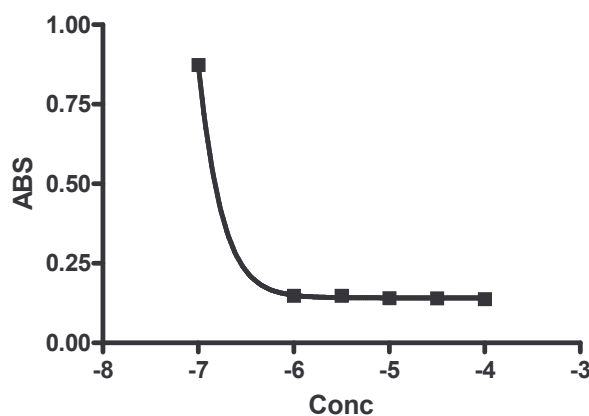


Fig.48. Grafico del DPPH scavenging test per l'estratto *n*-BuOH ($4.80 \cdot 10^{-8}$ M)

PARTE SPERIMENTALE

La purificazione dei prodotti è stata ottenuta attraverso cromatografia su colonna solido-liquido, utilizzando come fase stazionaria gel di silice (Macherey-Nagel 200-400 mesh) e come fase mobile miscela $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$.

I profili di eluizione sono stati definiti tenendo conto dei valori di R_f ricavabili dalle TLC con Kieselgel 60 F₂₅₄ (rilevate con vanillina).

Per la TLC sono state usate lastre di silice Merck stratificata su vetro, del tipo Kieselgel 60 F254, 0.25 mm.

Per la cromatografia liquido-liquido (DCCC) sono stati usati un apparecchio DCC-A, costruito dalla Rikakikai Co. Di Tokyo munito di 250 colonne (diametro interno 3 mm).

Per la cromatografia HPLC si è fatto uso di una colonna semipreparativa Waters μ -Bondapak C-18 (300 \times 7.80 mm; flusso 4.0 mL min⁻¹) ed in altri casi di colonna analitica Waters μ -Bondapak C-18 (250 \times 3.9 mm flusso 1.5 mL min⁻¹) o di colonna Phenomenex Luna C-18 (3 μ , 150 \times 4.60 mm; flusso 1.0 mL min⁻¹) tutti su apparecchio Waters munito di pompa modello 501 di iniettore Waters e rifrattometro differenziale modello 401.

Jaspamidi: Gli spettri ¹H NMR sono stati realizzati su un apparecchio VARIAN UNITY INOVA 700 MHz. Per le misurazioni in CDCl_3 è stato usato come standard il segnale relativo al CDCl_3 a δ_{H} 7.26 ppm. I valori ¹H NMR sono riportati in δ (ppm), i valori di J sono riportati in Hz.

Le analisi spettrometriche sono state effettuate facendo uso di uno spettrometro di massa Applied Biosystem Api 2000 provvisto di una sorgente ESI.

Metaboliti da piante: Gli spettri ¹H NMR sono stati realizzati su un apparecchio VARIAN UNITY INOVA 500 MHz. Per le misurazioni in CD_3OD è stato usato come standard il segnale relativo al CD_3OD a δ_{H} 3.31 ppm mentre per quelle in CDCl_3 è stato usato come standard il segnale relativo al CDCl_3 a δ_{H} 7.26 ppm. I valori ¹H NMR sono riportati in δ (ppm), i valori di J sono riportati in Hz.

Le analisi spettrometriche sono state effettuate facendo uso di uno spettrometro di massa Fisons VG-Prospec provvisto di sorgente FAB ed in altri casi di uno spettrometro di massa Applied Biosystem Api 2000 provvisto di una sorgente ESI.

Metodo di Mosher per jaspamidi

Ozonolisi ed idrolisi acida:

Tutte le jaspamidi (200 μg) sono state sottoposte ad ozonolisi in MeOH dry per 2h e 45' sotto flusso di O_3 , e successivamente la reazione è stata 'quenciata' con H_2O_2 per 4h.

L'idrolisi acida è stata effettuata con HCl 6N (0.5mL). Il campione è stato vaporizzato sotto vuoto spinto e portato a una temperatura di 120 °C per 12h. Il solvente è stato allontanato sotto vuoto e l'idrolizzato successivamente sottoposto a derivatizzazione.

Derivatizzazione con FDAA e LC/MS:

Un'aliquota del composto idrolizzato (800 µg) e dell'amminoacido standard (500 µg) sono stati sciolti in 80 µL di una soluzione TEA:MeCN (2:3) e trattati con 75 µL di FDAA all'1% in CH₃CN:acetone (1:2). Le vials sono state portate a una temperatura di 70 °C per 1h, successivamente la miscela è stata neutralizzata con HCl 0.2N (50 µL) e riportata a temperatura ambiente. Un'aliquota del derivatizzato è stata anidrificata sotto vuoto, diluita con MeCN al 5% in HCOOH in H₂O (1:1), e separato su colonna Vydac C₁₈ (25 x 1.8 mm i.d.) utilizzando un gradiente lineare che va dal 10% al 50% di acqua:acetonitrile contenente 5% di acido formico e 0.05% di acido trifluoroacetico, per 45 min a 1 mL/min. Il sistema RT-HPLC è stato collegato a una sorgente di massa Elettrospray, inserendo una valvola splitter e con un flusso all'interno dello spettrometro di massa di 100 µL/min. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità di ioni positivi ($m/z=320-900$). I dati sono stati analizzati utilizzando il programma Xcalibur; tutte le masse sono state riportate come valori medi, la temperatura del capillare fissata a 280 °C, il voltaggio a 3700 V.

Metodo di Mosher per metaboliti isolati da fonti vegetali

Una piccola quantità della molecola, in tampone citrato (1mL, pH=4.5), è stata trattata con *Charonia Lampas* (Shikagaku Kogyo CO. Ltd, Tokyo Japan) a 37°C. Dopo 3 giorni l'analisi su TLC ha evidenziato la scomparsa del prodotto di partenza e la presenza di una nuova e più intensa macchia. La miscela è stata purificata usando una cartuccia Sep-Pak lavata con H₂O ed eluita con metanolo. Il metanolo è stato fatto allontanare al rotavapor ed il residuo solido ottenuto purificato mediante HPLC usando una colonna analitica µ-Bondapack C18 (250 × 7.80 mm; flow rate 1.5 mL min⁻¹), e una miscela MeOH:H₂O 85:15 per la molecola iniziale privata della porzione zuccherina. Quest'ultima è stata sciolta in 1 ml CH₂Cl₂ anidro; la soluzione è stata fatta reagire con il cloruro dell'acido (+)-α-metossi-α-(trifluorometil)-fenilacetico (MTPA-Cl) (5 µl) in presenza di trietilammina (10 µl), con quantità catalitiche di 4-N,N'-dimetilamminopiridina (DMAP). La miscela è stata posta sotto agitazione a 25° C per 30 min. Dopo evaporazione del solvente, la miscela è stata purificata mediante cromatografia su colonna usando gel di Silice (Macherey-Nagel Kiesegel 70-230 mesh) usando come eluente CHCl₃.

Saggi di attività farmacologica

Jaspamidi:

Saggi di attività citotossica:

Le cellule tumorali umane di tipo MCF-7 (carcinoma della mammella) e HT-29 (carcinoma del colon), provenienti dall' American Type Culture Collection, sono state coltivate in DMEM contenente il 10% di siero fetale bovino e 50 µg/ml di gentamicina seguendo le tecniche standard. Per determinare gli effetti dei composti da testare sulla proliferazione, le cellule sono state deposte su piastre contenenti 96 pozzetti e lasciate attecchire per 24 ore.

Differenti concentrazioni (0.05-50 µM) dei composti da testare sono state introdotte nei pozzetti e le cellule sono state incubate per le successive 72 ore. Alla fine di questo periodo di tempo, il numero di cellule vive è stato determinato utilizzando il saggio di binding della sulforodamina. La percentuale di cellule morte, invece, è stata calcolata come il decremento percentuale di cellule nel saggio della sulforodamina rispetto alle colture di controllo.

Saggi di Immunofluorescenza:

Saggi di immunofluorescenza sono stati eseguiti usando linee cellulari di muscolo di ratto A10. Microtubuli e microfilamenti sono stati trattati con anticorpi monoclonali anti-β-tubulina e anti-actina e visualizzati con fluoresceina coniugata con IgG di topo.

metaboliti isolati da fonti vegetali:

Saggio TBARS: Il reattivo usato è composto da acido tiobarbiturico (TBA), HCl 12N e acido tricloroacetico al 100%, che viene aggiunto ad una aliquota di LDL.

Dopo una bollitura in un bagno a secco (100°C per 15 min) le provette vengono raffreddate ed il contenuto centrifugato.

Il sovranatante viene analizzato allo spettrofotometro a 532 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbono i gruppi SH.

Viene utilizzato come controllo positivo e per l'ossidazione dei campioni il CuSO₄

Le LDL sono diluite alla concentrazione di 200 µg/ml con PBS. I campioni vengono suddivisi nei seguenti gruppi:

- Controlli, a cui viene aggiunto il solo veicolo (etanolo, concentrazione finale nel campione = 0.25%).
- Ossidati, a cui è stato aggiunto CuSO₄ (5µM).

DPPH scavenging test: Il 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) forma una soluzione intensamente colorata in rosso porpora. In seguito ad una reazione di tale radicale con gli

estratti introdotti in soluzione, quest'ultima può decolorarsi e tale decolorazione è misurabile allo spettrofotometro.

Ad una soluzione di 15 μM di DPPH sono stati aggiunti i campioni a diverse concentrazioni (10^{-6} M ; $5 \times 10^{-6}\text{ M}$; 10^{-5} M , $5 \times 10^{-5}\text{ M}$; 10^{-4} M). Dopo 15 minuti di incubazione è stata letta l'assorbanza a 517 nm (lunghezza d'onda a cui assorbono i doppi legami che si instaurano tra la molecola di DPPH e gli antiossidanti) e paragonata al controllo.

E' stato successivamente calcolato l' EC_{50} , i cui valori possono essere confrontati con quelli dell' EC_{50} di noti antiossidanti, utilizzati come riferimento:

Idrossitiroso $\text{EC}_{50} = 2,6 \times 10^{-7}\text{ M}$

Vitamina E $\text{EC}_{50} = 5,04 \times 10^{-6}\text{ M}$

Dosaggio dei polifenoli: L'insieme dei composti fenolici viene ossidato dal reattivo di Folin, che si riduce in una miscela di ossidi blu. Tale colorazione si può leggere allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 725 nm.

E' stata allestita una retta standard di acido gallico a diverse concentrazioni ed, in seguito ad opportune prove di diluizione, sono stati dosati 2,5 μl di ciascun campione. Le varie aliquote sono state diluite con etanolo fino ad un volume finale di 200 μl e ad ognuna di esse è stato aggiunto successivamente il reattivo di Folin. Dopo un'incubazione di 3 minuti, ad ogni provetta sono stati aggiunti 100 μl di una soluzione satura di carbonato di sodio e con l'aggiunta di H_2O bidistillata si è ottenuto un volume finale di 2500 μl . Retta standard e campioni sono stati quindi incubati al buio per 1 ora e poi è stata letta allo spettrofotometro l'assorbanza del gruppo cromoforo formatosi.

I dati ottenuti sono espressi in milligrammi di polifenoli per grammo di campione.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Goodman & Gilman. *Le basi farmacologiche della terapia*. Hardman JG, Limbird LE (Ed). Bologna: Zanichelli; **1992**.
- ² Grant, R.E., *The Cyclopaedia of Anatomy and Physiology*, Todd, R.B., ed; vol.1, **1836**.
- ³ Perry, N.B.; Blunt J.W.; Munro, M.H.G.; Pannel L. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4850.
- ⁴ Minale, L.; Riccio, R.; Sodano, G.; *Tetrahedron Lett.* **1974**, *18*, 1301.
- ⁵ Scheurer, P.J.; de Silvia, E.D. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1611.
- ⁶ Cimino, G.; De Stefano S.; Minale, L. *Experientia* **1974**, *30*, 846.
- ⁷ Kobayashi, M.; Kondo, K.; Kitagawa, I. *Chem Pharm Bull.* **1988**.
- ⁸ (a) Distanza, A., Carlier, MF, Stradal, TE., Didry, D., Frittoli, E., Gonfalonieri, S., Croce, A., Wehland, J., Di Fiore, PP., Scita, G., *Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments* **2004**, 1180-1188. (b) Jordon A. et al. *Med. Rev.* **1998**, *10*, 259-296. (c) Jordan, M.A., Wilson, L. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1998**, *10*, 123-130.
- ⁹ (a) Nabi, I.R.; *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 1803-1811. (b) Waterman-Store, C.M.; Salmon, E.D. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 61-67.
- ¹⁰ Hermann, H. Aebi, U. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2000**, *12*, 79-90.
- ¹¹ (a) Carlier, M.F.; Pantaloni, D.; *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 459-467. (b) Wear, M.A.; Schafer, D.A.; Cooper, J.A. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, R891-R895. (c) Pantaloni, D.; Le Clainche, C.; Carlier, M.F. *Science* **2001**, *292*, 1502-1506.
- ¹² Neuhaus, J.M.; Wanger, M.; Keiser, T. Wegner, A. J. *Muscle Res. Cell Motil.* **1983**, *4*, 507-527.
- ¹³ Pollard, T.D.; *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 607-611.
- ¹⁴ Jordon, A.; Hadfield, J.A.; Lawrence, N.J.; McGown, A.T.; *Med Res. Rev.* **1998**, *4*, 259-296.
- ¹⁵ Green, K.J.; Goldman, R.D.; *Cell Motil.* **1983**, *3*, 283-305.
- ¹⁶ Hung, D.T.; Chen, J.; Schreiber, S.L. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 287-293.
- ¹⁷ Fenteany, G.; Shoutian Zhu; *Curr. Top. In Med. Chem.* **2003**, *3*, 593-616.
- ¹⁸ Aldridge, D.C.; Armstrong, J.J.; Speake, R.N.; Turner, W.B. *Chem. Commun.*, *1*, 26-27.
- ¹⁹ Kashman, Y.; Groweiss, A.; Shmueli, U. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3629-3632.
- ²⁰ Couè L.; Brenner, S.L.; Spector I, Korn, E.D. *FEBS Letter*, **1985**, *213*, 316-8.
- ²¹ (a) Carmely, S.; Kashmau, Y. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 511. (b) Kato, Y.; Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K.; Sakai, R.; Riga, T. Kashman, Y. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6225-6228. (c) Kobayashi, M.; Tanaka, J.; Katori, T.; Matsuura, M.; Kitagawa, I.

- Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2963. (d) Kobayashi, M.; Tanaka, J.; Katori, T.; Matsuura, M.; Yamashita, M.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38, 2409-2418. (e) Doi, M.; Ishida, T.; Kobayashi, M.; Kitagawa, I. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3629. (f) Tsukamoto, S.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Kobayashi, M.; *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **1991**, 1, 3185-3188 (g) Todd, J.S.; Alvi, K.A.; Crews, P. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 441-2 (h) Kobayashi, M.; Kawazoe, K.; Okamaoto, T.; Sasaki, T.; Kitagawa I. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 19-26.
- ²² (a) D'Auria, M.V.; Gomez-Paloma, L.; Minale, L.; Zampella, A.; Verbist, J.F.; Roussakis, C.; Debitus, C. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 8645-8657. (b) D'Auria, M.V.; Gomez-Paloma, L.; Minale, L.; Zampella, A.; Verbist, J.F.; Roussakis, C.; Debitus, C.; Patissou, J. *Tetrahedron* **1994**, 50, 4829-4834. (c) Carbonelli, S.; Zampella, A.; Randazzo, A., Debitus, C.; Gomez-Paloma, L.; *Tetrahedron* **1999**, 55, 14665-14674 (d) Zhang, X.; Minale, L.; Zampella, A.; Smith, C.D.; *Cancer Research* **1997**, 57, 3751-3758 (e) Bassarello, C.; Bifulco, G; Zampella, A.; D'Auria, M.V.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 39-44.
- ²³ Matsunaga, Shigeki; Fusetani, Nobuhiro; Hashimoto, Kanehisa; Koseki, Koshi; Noma, Masana. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 847-9.
- ²⁴ Kobayashi, Junichi; Murata, Osamu; Shigemori, Hideyuki; Sasaki, Takuma *Journal of Natural Products* **1993**, 56, 787-91.
- ²⁵ (a) Klenchin, V.A.; Allingham, J.S.; King, R.; Tanaka, J.; Marriott, G.; Rayment, I.; *Nat. Struct. Biol.*, **2003**, 10, 1058-1063. (b) Tanaka, J.; Yan, Y.; Choi, J.; Bai, J.; Klenchin, V.A.; Rayment, I.; Marriott, G.; *PNAS*, **2003**, 100, 13851-13856.
- ²⁶ Visegràdy, B.; Lorinczy D., Hild, G.; Somogyi, B.; Nyitrai M. *FEBS Letters* **2004**, 565, 163-166.
- ²⁷ Usui, T.; Kazami, S.; Dohmae, N.; Massimo, Y.; Kondo, H.; Tsuda, M.; Terasaki, A.G.; Ohashi, K.; Kobayashi, J.; Osada, H. *Chem. & Biol.* **2004**, 11, 1296-1277.
- ²⁸ (a) Chan, W. R.; Tinto, W. F.; Manchand, W. F.; Todaro, L. J.; *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 3091-3093. (b) Grieco, P. A.; Perez-Medrano, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4225-4228 (c) White, J. D.; Amedio, J. C.; *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 736-738.; (d) Hiray, Y.; Yokota, K.; Yamazaky, T.; Momose, T.; *Heterocycles* **1990**, 30, 1101-1119; (e) Shioiri, T.; Imaeda, T.; Hamada, Y.; *Heterocycles* **1997**, 46, 421-442.
- ²⁹ (a) Zabriskie, T. M.; Klocke, J. A.; Ireland, C. M.; Marcus, A. H.; Molinski, T. F.; Faulkner, D. J.; Xu, C.; Clardy, J. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3123-3124. (b) Crews, P.; Manes, L. V.; Boehler, M.; *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2797-2800.
- ³⁰ Crews, P.; Frias, J.J.; Emrich, R.; Keifer, P.A.; *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2932-2934.
- ³¹ Talpir R. *et al. Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4453-4456.

-
- ³² (a) De Silva, E.D.; Andersen, R.J.; Allen, T.M. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 489-492. (b) Coleman, J.E.; De Silva, E.D.; Kong, F.; Andersen, R.J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *51*, 10653-10662.
- ³³ (a) Bubb, M.R.; Senderowicz, A.M.J.; Sausville D.A.; Duncan, K.L.K.; Dorn, E.D. *J.Biol.Chem.***1994**, *269*, 14869-14871. (b) Bubb, M.R.; Spector, I.; Beyer, B.B.; Fosen, M.K. *J.Biol.Chem.***2000**, *275*, 5163-5170.
- ³⁴ (a) Visegrády, B.; Lorinczy, B.; Hild, G.; Somogyi, B.; Nytrayi, M. *FEBS Lett.* **2004**, *565*, 163-166 (b) Visegrády, B.; Lorinczy, B.; Hild, G.; Somogyi, B.; Nytrayi, M. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6-10.
- ³⁵ Zampella, A.; Giannini, C.; Debitus, C.; Roussakis, C.; D'Auria, M. V.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 332-334.
- ³⁶ Kupchan S.M.; Britton R.W.; Ziegler, M.F.; Sigel, C.W. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 178-79
- ³⁷ Marfey, P.; *Carlberg Ress. Commun.*,**1984**, *49*, 591-596.
- ³⁸ Terracciano, S.; Bruno, I; Bifulco, G.; Avallone, E.; Smith, C.D.; Paloma, L.G.; Riccio, R, *Bioorg. Med Chem*, **2005**, *13* (17) 5225-52239.
- ³⁹ Linnaeus C., *Species plantarum*, **1753** Stockholm.
- ⁴⁰ Bosland P.W., Votava E. J., *Peppers: vegetable and spice Capsicum*, Departement of Agronomy and Horticulture, New Mexico State University , Las Cruces, USA. *CABI publishing* **2000**, 250pp.
- ⁴¹ Crombie et al. *J. Chem. Soc*, **1955**, 1025.
- ⁴² Fujimoto et al. *Food Sci. Techol.* **1978**, 294.
- ⁴³ Paulini R., Muller K., Diederich F. *Angew. Chem. Int.*, **2005**, *44*, 1788-1805.
- ⁴⁴ Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B., Martin W.J., Trafton J., Peterson-Keitz K.R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. *Science*, **2000**, *288*, 306-313.
- ⁴⁵ (a) Sim.et al. *Yakhak Hoechi*, **1964**, *8*, 69. (b) Kuiumdzhiev.C. R. *Acad. Bulg. Sci*, **1965**, *18*, 799.
- ⁴⁶ Jones, N. L.; Shabib, S., Sherman, P. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *146*, 223–227.
- ⁴⁷ Lehmann S., *Cancer Research* **2006**, *66*, 3222-3229.
- ⁴⁸ Osuna-Garcia, J. A.; Wall, M. M.; Waddell, C. A.. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5093–5096.
- ⁴⁹ (a) Materska, M.; Perucka, I. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1750–1756. (b) Lee Y., Howard L.R., Villalon B. *J. Food Sci*, **1995**, *60*, 473-476.

-
- ⁵⁰ Leighton et al., *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*, **1992**, 220-238.
- ⁵¹ (a) Marston et al, *Saponins*, **1995**. (b) Lipking et al, *Science news*, **1995**; 148: 392-393.
- ⁵² Lim K., Yoshioka M., Kikuzato S., Kiyonaga A., Tanaka H., Shindo M., Suzuki M. *Med Sci Sports Exerc*, **1997**, 29(3), 355-61.
- ⁵³ (a) Sauvaire et al. *Saponins Used in Food and Agriculture*, **1996**, 37.(b) Kentaro I., Yutaka E., **1996**, 67, 57-59,.
- ⁵⁴ (a) Izumitani, Y.; Yahara, S.; Nohara, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38, 1299–307.(b) Yahara, S.; Kobayashi, N.; Izumitani, Y.; Nohara, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 3258–60.
- ⁵⁵ Yahara, M.; Nohara, T.; Irino, N.; Okuda, H.; Izumitani, Y. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* **1990**, 14.
- ⁵⁶ Hodges, R.; Porte, A.L. *Tetrahedron*, **1964**, 20, 1463-1467.
- ⁵⁷ Miyase, T. et al. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 2475–2484.
- ⁵⁸ (a) Badoc, A.; Deffieux, G.; Lamarti, A.; Bourgeois, G.; Carde, J. P., *J. Essent. Oil Res.* **1994**, 6, 333–336. (b) Piccaglia, R.; Marotti, M., *J. Agr. Food Chem* **2001**, 49, 239–244
- ⁵⁹ Betts Tj. et al. *J.Pharm.Pharmacol.* **1968**, 20, 469-72
- ⁶⁰ Ono, M.; Ito, Y.; Ishikawa, T.; Kitajima, J.; Tanaka, Y.; Niiho, Y.; Nohara, T., *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44, 337–342.
- ⁶¹ Namavar, J.B.; Tartifidazeh, A.; ; Khabnadideh, S. *Int.J. Gyneac. Obstet.* **2003**, 80, 153-7
- ⁶² Albert-Puleo, M. et al. *J. Ethnopharmacol.* **1980**; 2, 337-344.
- ⁶³ Tanira, M. O. M.; Shah, A. H.; Mohsin, A.; Ageel, A. M.; Qureshi, S., *Phytotherapy Research* **1996**, 10, 33–36.
- ⁶⁴ Forster, H. B.; Niklas, H.; Lutz, S., *Planta Medica* **1980**, 40, 309–319
- ⁶⁵ Birkner, B. et al. *MMW Fortschr Med* **2004**, 146, 12-13.
- ⁶⁶ Boskabady, M.H.; Khatami, A.; Nazari A *Pharmazie*, **2004**, 19, 561-4.
- ⁶⁷ Haze, S.; Sakai, K.; Gozu, Y. *Jpn J. Pharm.* **2003**, 90, 247-253.
- ⁶⁸ Choi, E.M.; Hwang, G.K. *Fitoterapia*, **2004**, 75, 557-565.
- ⁶⁹ Ozbek, H.; Ugras, S.; Dulger, H.; Bayram, I.; Tuncer, I.; Ozturk, G.; Ozturk, A., *Fitoterapia* **2003**, 74, 317–319.
- ⁷⁰ Ruberto, G.; Baratta, M. T.; Deans, S. G.; Dorman, H. J. D. *Planta Medica* **2000**, 66, 687–693.
- ⁷¹ Suzuki, K.; Shimizu, T.; Kawabata, J.; Mizutani, J. *Agricultural and Biological Chemistry* **1987**, 51, 1003-8.

-
- ⁷² Sheng, et al *Shanghai Yike Daxue Chubanshe*, **1999**, 26, 395-399.
- ⁷³ Ono, M.; Ito, Y.; Kinjo, J.; Yahara, S.; Nohara, T.; Niiho, Y., . *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, 43, 868–871.
- ⁷⁴ Nyemba, A. M.; Mpondo, T. N.; Kimbu, S. F.; Connolly, J. D., *Phytochemistry* **1995**, 39, 895–898.
- ⁷⁵ Della Graca, M.; Ferrara, M.; Fiorentino, A.; Monaco, P.; Previtera, L. *Phytochemistry* **1998**, 49, 1299–1304.
- ⁷⁶ Park, H. J., *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 1128–1130.
- ⁷⁷ Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, Olaf., . *Magnetic Resonance in Chemistry* **2003**, 41, 636–638.
- ⁷⁸ Guyot, M.; Durgeat, M., *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, 1391–2.
- ⁷⁹ Coleman, B. E.; Cwynar, V.; Hart, D. J.; Havas, F.; Mohan, J. M.; Patterson, S.; Ridenour, S.; Schmidt, M.; Smith, E.; Wells, A. J.. *Synlett* **2004**, 8, 1339–1342.
- ⁸⁰ Louter, A. J. H., *Journal of AOAC International* **2004**, 87, 485–492.
- ⁸¹ Berry, P.E.; Hipp, A.L.; Wurdack, K.J.; Van, E.E.B.; Riina, R., *Am. J. of Botanic*, **2005**, 92, 1520.
- ⁸² Cobo, B. *Historia del Nuevo Mundo*, **1653**.
- ⁸³ Milanowsky, D.J., Winter, R.E., Elvin-Lewis, M.P.F., Lewis, W.H., *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 814-8.
- ⁸⁴ Pieters L., De Bruyne T., et al. *Phytomedicine* **1995**, 2(1), 17-22.
- ⁸⁵ (a) Vaisberg AJ., Milla M., et al. *Planta Medica*. **1989**, 55, 140-143. (b) Pieters L., De Bruyne T., et al *Planta Medica* **1989** 58, Suppl 1, A582-A583.
- ⁸⁶ Porras-Reyes B.H., Lewis W.H., Roman J., Simchowitz L., Mustoe T.A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1993**, 203, 18-25.
- ⁸⁷ Persinos Perdue G., Blomster R.N., Blake D.A., Farnsworth N.R. *J. Pharmaceutical Science* **1979**, 68, 124-126.
- ⁸⁸ Miller M.J.S., Vergnolle N., et al. *J. Investigative Dermatology*; **2001**, 117, 217-235.
- ⁸⁹ (a) Miller M.J.S, Reuter B.K. et al. *Itch: Basic Mechanisms and Therapy*. Marcel Dekker; **2003**. pp. 311–320. (b) Phillipson, J. D., *Phytochemistry* **1995**, 38, 1319.
- ⁹⁰ Miller M.J.S, Brobrowsky, P. et al. *J.Inflamm.* **2007**, 4-16.
- ⁹¹ Chen ZP., Cai Y., Phillipson JD. *Planta Medica* **1994**, 60(6), 541-5.
- ⁹² Cai Y, Chen ZP, Phillipson JD *Phytochemistry*. **1993**, 32, 755–760.

- ⁹³ (a) Aquino R., De Feo V., De Simone F., De Tommasi N., Pizza C. Gutemberg Edizioni, Salerno **1996**. (b) Ubillas, R., Jolad, S.D., Bruening, R.C., Kernan, M.R., King, S.R., Sesin, D.F., Barrett, M., Stoddart, C. A., Flaster, T., et al. *Phytomedicine* **1994**, *1*, 77.
- ⁹⁴ Miller M.J.S., MacNaughton W.K. et al. *Amer. J.Physiol.* **2000**, *279*, G192-G200.
- ⁹⁵ Risco E., Ghia F., Vila R., Iglesias J., Alvarez E., Canigueral S.: *Planta Medica* **2003**, *69*(9), 785-94.
- ⁹⁶ (a) Itokawa H., Ichihara Y., et al. : *Chem Pharm Bull* **1991**, *39*, 1041-1042. (b) Pieters L., de Bruyne T. et al.: *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 899-906. (c) Sandoval M., Charbonnet R.M., Clark M., Trentacosti A.M., Miller M.J.S. *J. Ethnopharmacology.* **2002**; *80*, 121-129
- ⁹⁷ Desmarchelier, C., Witting Schaus, F., Coussio, J., Cicca, G. *Journal of Ethnopharmacology* **1997**. *58*, 103.
- ⁹⁸ Safrin S., McKinley G., McKenough M., Robinson D., Spruance S.L. *Antiviral Res.*, **1994** *25*, 185-192.
- ⁹⁹ Orozco-Topete R., Sierra-Madero J., Cano-Dominguez C., Kershenovich J., Ortiz-Pedroza G, Vazquez-Valls E., Garcia-Cosio C., Soria-Cordoba A., Armendariz AM, Teran-Toledo X, Romo-Garcia J., Fernandez H. and Rozhon E.J. **1997**: *Antiviral Res.*, *35*, 91-10.
- ¹⁰⁰ Gabriel SE., Davenport SE., Steagall RJ., Vimal V., Carlson T., Rozhon EJ.: *American J. Physiology.* **1999**, *276*, 58-63.
- ¹⁰¹ Holidniy M, Kock J., Mistal M, Schmidt J.M., Khandwala A., Pennington J.E., Porter S.B. *Am J Gastroenterol.* **1999**; *94* 3267-3273.
- ¹⁰² (a) Di Cesare D, Dupont HL, Mathewson JJ, Ericsson CD, Ashley D, Matinez-Sandoval FG, Pennington JE and Porter SB **1998**: *36th Annual Meeting, Denver*. (b) Jones, K.,. *J. of Alternative and Complementary Medicine* **2003**, *9* 877.
- ¹⁰³ Cai, Y., Evans, F.J., Roberts, M.F., Phillipson, J.D., Zenk, M.H., Gleba, Y.Y.,. *Phytochemistry* **1991** *30*, 2033.
- ¹⁰⁴ Youkwan, J., Srisomphot, P., Sutthivaiyakit, S., *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1006.
- ¹⁰⁵ Otsuka, H., Kijima, H., Hirata, E., Shinzato, T., Takushi, A., Bando, M., Takeda, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **2003**, *51*, 286.
- ¹⁰⁶ Gonzales, A.G., Guillermo, J.A., Ravelo, A.G., Jmenez, I. A., Gupta, M.P., *J. Nat. Prod.* **1994** *57*, 400-404.
- ¹⁰⁷ De Marino, S., Borbone, N., Zollo, F., Ianaro, A., Di Meglio, P., Iorizzi, M.,. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7525-29.
- ¹⁰⁸ Pieters, L., de Bruyne, T., Claeys, M., Vlietinck, A., Calomme, M., vanden Berghe, D. J. *Nat. Prod.* **1993**, *56*, 899.

-
- ¹⁰⁹ Sinkkonen, J., Karonen, M., Liimatainen, J., Pihlaja, K., *Magnetic Resonance in Chemistry* **2006**, *44*, 633-8.
- ¹¹⁰ Baltenweck-Guyot, R., Trendel, J.M., Albrecht, P., Schaeffer, A. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6178-72.
- ¹¹¹ Cai, Y., Chen, Z.P., Phillipson, J.D., *Phytochemistry* **1993**, *32*, 755
- ¹¹² Achenbach, H., Hemrich, H. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1957-9.
- ¹¹³ Merrit, A.T.; Ley, S.V., *Natural Product Reports* **1992**, *9*, 243-287.